

Aus dem Pharmakologischen Institut  
der Freien Universität Berlin  
Direktor: : Prof. Dr. med. Hans Herken

---

**Einfluß von Chloramphenicol und  
Oxytetracyclin auf die Cytochromoxidase-  
aktivität verschieden schnell proliferierender  
Gewebe**

**Untersuchungen zum toxischen Prinzip  
proteinsynthesehemmender Antibiotika**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Detlef Oerter**  
aus Berlin

**1973**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41550802\\_0046](https://archive.org/details/IA41550802_0046)







Aus dem Pharmakologischen Institut  
der Freien Universität Berlin  
Direktor.: Prof. Dr. med. Hans Herken

---

**Einfluß von Chloramphenicol und  
Oxytetracyclin auf die Cytochromoxidase-  
aktivität verschieden schnell proliferierender  
Gewebe**

**Untersuchungen zum toxischen Prinzip  
proteinsynthesehemmender Antibiotika**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an den Medizinischen Fachbereichen  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Detlef Oerter**  
aus Berlin

Referent: Professor Dr. Neubert

Korreferent: Professor Dr. Kröger

Promotionsdatum: 7.8.1973



## INHALT

|                                                                                                          |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. EINLEITUNG                                                                                            | 2       |
| 2. METHODEN                                                                                              | 6 - 15  |
| 2.1 Versuchstiere                                                                                        | 6       |
| 2.2 Präparation und Homogenisieren der Organe                                                            | 6       |
| 2.3 DNA-Bestimmung                                                                                       | 7       |
| 2.4 Bestimmung des Häm-Gehaltes                                                                          | 7       |
| 2.5 Partielle Hepatektomie                                                                               | 7       |
| 2.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen                                                              | 7       |
| 2.7 Intravenöse Dauerinfusion                                                                            | 8       |
| 2.8 Bestimmung der Chloramphenicolkonzentration                                                          | 13      |
| 2.9 Teratologische Untersuchungen                                                                        | 14      |
| 2.10 Statistische Methoden                                                                               | 14      |
| 2.11 Messung der Atmung                                                                                  | 15      |
| 2.12 Hämatologische Untersuchungen                                                                       | 15      |
| 3. ERGEBNISSE                                                                                            | 16 - 81 |
| 3.1 Messung der Cytochromoxidaseaktivität mit der Sauerstoff-Elektrode                                   | 16      |
| 3.2 Untersuchungen über den Einfluß von Antibiotika auf Cytochromoxidase-Aktivität und Wachstumsvorgänge | 32      |
| 3.2.1 Regenerierende Leber                                                                               | 32      |
| 3.2.2 Embryonen - Cytochromoxidase                                                                       | 36      |
| 3.2.3 Embryonen - Atmung                                                                                 | 44      |
| 3.2.4 Embryonen - Hämsynthese                                                                            | 47      |
| 3.2.5 Embryonen - Elektronenmikroskopie                                                                  | 50      |
| 3.2.6 Embryonen - Teratologie                                                                            | 59      |
| 3.2.7 Knochenmark                                                                                        | 60      |
| 3.2.8 Hoden                                                                                              | 65      |
| 3.2.9 Morris-Hepatome und Leber                                                                          | 71      |
| 3.2.10 Dünndarmepithel - Elektronenmikroskopie                                                           | 79      |
| 4. DISKUSSION                                                                                            | 82      |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG                                                                                       | 87      |
| 6. LITERATUR                                                                                             | 89      |

## 1. EINLEITUNG

Von einer optimalen Chemotherapie forderte EHRLICH 1906 eine maximale Wirkung auf den Mikroorganismus bei möglichst geringer Toxizität gegenüber dem Warmblüter. Diesem Verlangen nach selektiver Schädigung des Bakterienstoffwechsels glaubte man bei den Antibiotika Chloramphenicol und Tetracyclin durch den Nachweis zu genügen, daß sie im Bereich therapeutisch wirksamer Konzentrationen nur die bakterielle Proteinsynthese, nicht aber diejenige an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums der Warmblüter von Eucaryonten hemmen.

Seit dem Ende der Fünfziger Jahre aber häuften sich morphologische und biochemische Befunde, die auf eine Ähnlichkeit im Nukleinsäure- und Protein-Stoffwechsel von Mitochondrien und Bakterien hinwiesen. 1960 gelang RODDY an Mitochondrien aus Rattenleber der Nachweis einer spezifischen Proteinsynthese, die wie diejenige der Bakterien durch niedrige Konzentrationen von Chloramphenicol gehemmt werden kann.

In den Mitochondrien, und zwar an ihrer inneren Membran, sind z.B. die für eine Zelle lebensnotwendigen Komponenten der Atmungskette lokalisiert, und ihr Endglied ist die Cytochromoxidase, die die Elektronen auf den Sauerstoff überträgt.

Nach dem Nachweis der Fähigkeit von Mitochondrien zur Proteinsynthese interessierte deshalb eine mögliche Beziehung zwischen den toxischen Wirkungen dieser Antibiotika und der Auswirkung einer Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese. Eine Synthesehemmung von Mitochondrien-Membranen und von Cytochromoxidase wurde in der Arbeitsgruppe von LINNANE zuerst an Hefen und später auch an Säugetierorganen gefunden (FIRKIN und LINNANE, 1969). DE VRIES und KROON konnten analoge Veränderungen zusätzlich mit Oxytetracyclin erzeugen. Als Modell diente in diesen Untersuchungen die regenerierende Leber der Ratte nach partieller Hepatektomie. In dem Versuchszeitraum dieser Experimente - 72 Stunden post operationem - durchlief das Gewebe im Durchschnitt nur eine Mitose, und trotz der gemessenen Hemmung der de-novo-Synthese der Cytochromoxidase kam es zu keiner Beeinträchtigung des Gesamtwachstums der Leber.

Wird ein Gewebe über mehrere Mitosen mit Chloramphenicol und Oxytetracyclin behandelt, so sollte dies zu einer stärkeren Hemmung der Neubildung und damit der Aktivität der Cytochromoxidase führen, mit möglichen Konsequenzen für Atmung und Wachstum. Wir haben daher dieses Problem eingehender untersucht.

Antiproliferative Wirkungen auf die Hämatopoëse des Menschen sind vom Chloramphenicol schon lange bekannt. Zwei Typen von Veränderungen müssen auseinandergehalten werden:

1. In sehr seltenen, unvorhersehbaren Fällen kann es bereits nach Einnahme von 2-4g und einer durchschnittlichen Latenzzeit von 3-4 Monaten zu einer irreversiblen, häufig tödlichen Knochenmarksaplasie kommen, für deren Pathogenese eine befriedigende Erklärung bislang nicht gefunden werden konnte (BEST; KEISER; FLENER und REMMELE).
2. Scharf davon zu trennen sind die bei Überdosierung oder schwerer Leberinsuffizienz unmittelbar unter der Therapie auftretenden und nach rechtzeitigem Absetzen voll reversiblen cytostatischen Symptome Anämie, Reticulocytopenie, Leukopenie, Thrombocytopenie. Diesen Veränderungen gehen Zeichen einer Eisenverwertungsstörung voraus: Anstieg des Serumeisens, erniedrigte Eisenclearance und verringerte Aufnahme von radioaktiv markiertem Eisen in die Zellen der Erythropoëse (RUBIN, WEISBERGER, BOTTI und STORAASLI).

Bei genügend hoher und langer Medikation muß mit dieser zweiten toxischen Schädigung bei allen Patienten gerechnet werden.

Versuche, die Hämatotoxizität des Chloramphenicols durch eine Beeinflussung des Nucleinsäure-Stoffwechsels zu erklären, schlugen fehl (YUNIS und HARRINGTON). Eine Hemmung der mikrosomalen Proteinsynthese beim Warmblüter wiesen WEISBERGER, WOLFE und ARMENTROUT nur nach Stimulierung durch Zusatz von "messenger"-RNA in vitro nach. Da sie selbst einräumen, daß in Säugetierzellen die messenger-RNA relativ "stabil, und - solange die Zelle zur Proteinsynthese fähig ist - fest an die Ribosomen gebunden ist", müssen sie postulieren, daß unreife Blutzellen eine Ausnahme von dieser Regel bilden, um so die Hemmung der mikrosomalen Proteinsynthese für die cytostatischen Wirkungen des Chloramphenicol verantwortlich machen zu können. Die Möglichkeit einer Beeinflussung der Bindung von m-RNA an Mikrosomen unter bestimmten Bedingungen kann aber auch im Falle anderer schnell proliferierender Gewebe zur Zeit nicht völlig ausgeschlossen werden.

Eine aus dem therapeutischen Prinzip folgende Zwangsläufigkeit aber wären die bei Überdosierung von Chloramphenicol auftretenden cytostatischen Symptome dann, wenn die oben erwähnte Ähnlichkeit zwischen bakteriellen und mitochondrialen Symptomen einerseits und die vitale Bedeutung bestimmter mitochondrialer Komponenten (z.B. Cytochromoxidase) für die Zelle andererseits berücksichtigt werden. Dann sollte Chloramphenicol an allen schnell proliferierenden Geweben z.B. die Synthese und damit die Aktivität pro Zelle der Cytochromoxidase hemmen. Insbesondere der Embryo in der Phase der Organogenese muß als geeignetes Modell zum Studium der Chloramphenicol-induzierten antiproliferativen Wirkungen angesehen

werden, da er zweifelsohne von allen Säugetierorganen die höchste Wachstumsrate aufweist (KÖHLER). Außerdem können Cytochromoxidaseaktivität und DNA-Gehalt während der Entwicklung verfolgt werden. Der Einfluß einer solchen Enzymsynthesehemmung auf embryonale Wachstums- und Differenzierungsvorgänge wird damit nachweisbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß von Chloramphenicol auf die Cytochromoxidaseaktivität in regenerierender Leber nach partieller Hepatektomie, im embryonalen Gewebe, im Knochenmark, im Hodenepithel, in Morris-Hepatomen und, - da biochemische Untersuchungen hierbei schwierig sind, - bei Dünndarmepithel nur auf die mitochondriale Ultrastruktur untersucht werden. Da DE VRIES und KROON bei regenerierender Leber mit hohen Dosen Oxytetracyclin ebenfalls eine Hemmung der Cytochromoxidasynthese fanden, ist der Versuch interessant, damit diesen Effekt an anderen schnell proliferierenden Geweben nachzuweisen.

Auch an einem mitotisch "inaktiven" Organ wie der Leber erwachsener Tiere kann der Einfluß dieser Antibiotika auf die Cytochromoxidaseaktivität in einem Langzeit-Versuch deshalb interessant werden, weil damit möglicherweise mit einer neuartigen Methode die Halbwertszeit einer typischen mitochondrialen, membran-gebundenen Komponente gemessen werden kann.

Chloramphenicol wird bei der Ratte schnell eliminiert, so daß nur mehrfache tägliche Injektionen hoher Dosen permanente Serumkonzentrationen erzeugen (FIRKIN und LINNANE). Dieses Problem wird in dieser Arbeit auf drei Wegen zu lösen versucht:

1. Durch partielle Hepatektomie, da Chloramphenicol erst nach Glukuronidierung in der Leber zum größten Teil eliminiert wird.
2. Durch Applikation als intravenöse Dauerinfusion.
3. Durch Verwendung des Chloramphenicolderivates Thiamphenicol mit offenbar identischem Wirkungsprinzip, aber längerer Serumhalbwertszeit.

Die vorliegende Arbeit hat folgende Ziele:

1. Prüfung einer Methode zur polarographischen Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität im Homogenat verschiedener Gewebe.
2. Erprobung einer Vorrichtung zur gleichzeitigen Intravenösen Dauerinfusion mehrerer Ratten über einen längeren Zeitraum ohne Immobilisation der Tiere.
3. Untersuchungen mit Hilfe dieser Methoden über den Einfluß von Chloramphenicol und Oxytetracyclin auf die Cytochromoxidaseaktivität in regenerierender

Leber, Embryonen, Knochenmark, Hodenepithel, Morris-Hepatomen sowie in der Leber erwachsener Tiere.

Parallel dazu wurden von Herrn Prof. Dr. MERKER, Anatomisches Institut der Freien Universität Berlin, elektronenoptische Untersuchung durchgeführt. Ihm sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

## 2. METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden 200-220g schwere weibliche Ratten des Stammes WISTAR SW 69 verwendet, für die Untersuchungen am Knochenmark 800-900g schwere Albino-Meerschweinchen, Stamm Pirbright.

Bei den Morris-Hepatomen handelt es sich um nicht metastasierende, leberzellähnliche ("minimal deviation"), chemisch induzierte Transplantations-tumoren bei Ratten des Stammes Buffalo. Verwendet wurden die beiden mittelschnell wachsenden Tumoren 5123D und 7800.

An dieser Stelle sei Herrn Prof.Dr.H.P.Morris von der Howard-University in Washington D.C., U.S.A., herzlich für die Überlassung der Tumortiere gedankt.

Die Tiere erhielten Altromin-R-Futter und hatten unbeschränkten Zugang zu Leitungswasser. Die Raumtemperatur betrug 25<sup>0</sup> C., die Luftfeuchtigkeit 50-60%.

#### Bestimmung des Alters der Feten

Zur Durchführung von biochemischen Untersuchungen an bestimmten Tagen der Schwangerschaft muß das genaue Alter der Feten bekannt sein. Da die hormonale Steuerung der Ovulation wahrscheinlich lichtabhängig ist, und der Ovulationstermin durch Veränderung der Belichtung verschoben werden kann, wurden die Tiere bei verändertem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, um die Ovulation in die Arbeitszeit zu legen und zudem von jahreszeitlichen Schwankungen unabhängig zu sein. Von 12 Uhr mittags bis 4 Uhr morgens hatten die Tiere Licht. Um 8 Uhr wurden jeweils drei Weibchen für 2 Stunden mit einem Männchen zusammengesetzt. Durch das Aufdecken von Spermien im Vaginalabstrich ließ sich feststellen, ob ein Coitus stattgefunden hatte. So kann der genaue Konzeptionstermin festgelegt werden. Der Tag nach der Konzeption bis 9 Uhr des folgenden Tages wird als Tag 0 bezeichnet.

### 2.2 Präparieren und Homogenisieren der Organe

Um die Mitochondrien und damit die Cytochromoxidase möglichst zu schonen, wurden die Organe nach Präparieren aus dem unmittelbar zuvor durch Dekapitation getötetem Tier in einem Glashomogenisator mit Teflonpistill der Fa. BRAUN-Meislungen in folgendem Medium nach SCHNAITMAN und GREENAWALT homogenisiert:

70 mM Saccharose, 220 mM Mannit, 0,2% BSA (=Rinderserumalbumin), fettsäurearm. 2 mM HEPES-Puffer (N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure) pH 7,4

### 2.3 Bestimmung des DNA-Gehaltes

Der DNA-Gehalt der Homogenate diente als Bezugssystem und wurde nach dreimaligem Waschen mit 2%iger Perchlorsäure und nachfolgender 15minütiger Extraktion bei 75°C mit 5%iger Perchlorsäure nach der Diphenylmethode von BURTON bestimmt.

### 2.4 Bestimmung des Hämgehaltes in embryonalem Gewebe

Hierbei muß bei der Präparation die Kontamination des Embryos mit maternalem Blut vermieden werden. Das wurde folgendermaßen erreicht: Nach vorsichtigem Einschnitt in die Uterusmuskulatur wird der Embryo in seinen intakten Eihäuten ohne Placenta herauspräpariert und durch mehrmaliges Eintauchen in 0,9%ige NaCl-Lösung gespült.

Ca. 0,8g Embryomaterial - sie entsprechen ca. acht 14-Tage alten Embryonen - werden mehrmals mit n/100 Acetatpuffer pH 7,4 gewaschen und abzentrifugiert, bis das gesamte Häm in Lösung geht und das Sediment gänzlich weiß ist. Der Überstand wird auf 10 ml aufgefüllt und mit 250 mg  $\text{NaHPO}_4$  versetzt. 1 ml dieser Lösung wird mit 3 ml Pyridinreagens (100 ml Pyridin + 30 ml NaOH + 170 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt, mit etwas Natriumdithionit reduziert und nach 3 bis 5 Minuten die Extinktion bei 557 nm abgelesen. Zur Ausschaltung von Trübungsfehlern wurde die bei 540 nm abgelesene Extinktion vom Meßwert subtrahiert. Der Hämgehalt wurde unter Berücksichtigung eines mikromolaren Extinktionskoeffizienten von 32 berechnet.

### 2.5 Partielle Hepatektomie

Zur Induktion der Leberregeneration wurden 160-170g schweren weiblichen Ratten zwei Drittel der Leber nach der von HIGGINS und ANDERSON angegebenen Methode unter Äthernarkose entfernt. Den scheinoperierten Kontrollen wurde nach alleiniger Laparotomie ohne partielle Hepatektomie die Wunde wieder vernäht.

### 2.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Unmittelbar nach der Präparation wurde das Material in Puffer nach KARNOVSKI (= 3% Paraformaldehyd, 3% Glutaraldehyd in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,2) fixiert. Nach Fixierung in 1%  $\text{OsO}_4$  in Phosphatpuffer von pH 7,2 wurde in aufsteigender Acetonreihe entwässert. Die Einbettung erfolgte in Mikropal-Kunstharz. Die Schnitte wurden mit einem LKB-Ultratom (ungefähr 500 - 700 Å) ausgeführt. Zur Kontrastierung wurde Uranylacetat-Bleiacetat benutzt. Die

Bilder wurden mit einem Siemens-Elmiskop 1 bei einer Primärvergrößerung von 10 500 bis 70 000 aufgenommen.

- 2.7 Es wurde eine Methode von BRECHER so modifiziert, daß gleichzeitig 15 Tiere ohne Immobilisation über mehrere Tage infundiert werden können. Um die Tiere an die Infusion anschließen zu können, mußten sie narkotisiert werden. Anfangs wurden zu diesem Zweck 100 mg Hexobarbital (Evipan<sup>R</sup>)/mg injiziert, eine Dosis, bei der die Tiere in der Regel nach ca. 60 Minuten erwachen. Nach Anschluß an die Chloramphenicol-Infusion starben sämtliche Tiere jedoch nach 3 bis 4 Stunden, ohne aus der Narkose zu erwachen. Aus den Untersuchungen von DIXON und FOUTS geht hervor, daß Chloramphenicol den Abbau von Hexobarbital in der Leber hemmt. Wir haben daher 7 Tieren 100 mg Chloramphenicol/kg Körpergewicht gleichzeitig mit 100 mg Hexobarbital/kg i.p. gegeben und 3 Kontrolltieren nur die gleiche Dosis Chloramphenicol und die Narkosedauer gemessen. Als Narkosedauer wurde die Zeit vom Narkosebeginn bis zum Aufrichten der Tiere aus der Rückenlage gewertet. Tab. 1 zeigt, daß die mit Chloramphenicol behandelten Tiere eine durchschnittlich 5mal längere Narkosedauer aufweisen als die Kontrollen. Eines der behandelten Tiere starb nach 60 Minuten.

Aus diesem Grunde haben wir für unsere weiteren Versuche Äther verwendet.

Die Vorrichtungen zum Anschluß an die Dauerinfusion ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Ein Polyäthylenkatheter (K) mit einem Außendurchmesser von ca. 0,3 mm wird über eine trogartig angeschliffene Kanüle in eine der Schwanzvenen (V) eingeführt und bis in die Höhe der Schwanzwurzel vorgeschoben. Eine Plexiglashülse (H) schützt Katheter und Aufhängevorrichtung vor Bissen, ein Haltefaden (F) und ein über den Katheter führender Halteschlauch (S), der durch eine Nadel (N) mit der Hülse verbunden ist, verhindern jegliche Zugbelastung des Katheters. Die Chloramphenicol-Lösung wird über ein frei drehbares, wasserdichtes Kupplungszwischenstück, das dem einzelnen in einem Glaskäfig untergebrachten Tier freie Beweglichkeit ermöglicht, von einer elektrisch getriebenen Pumpe (Modell UNITA der Fa. BRAUN-Melsungen) dem Tier infundiert. Das Infusionsvolumen beträgt 10 ml/24 Stunden. Eine parallel dazu angeschlossene Meßpipette erlaubt die Kontrolle der Konstanz der Infusionsgeschwindigkeit. Mit dieser Methode wurden bis zum Abschluß dieser Arbeit mehr als 200 Tiere erfolgreich infundiert. Abb. 2 zeigt einen Teil der Anlage in Betrieb.



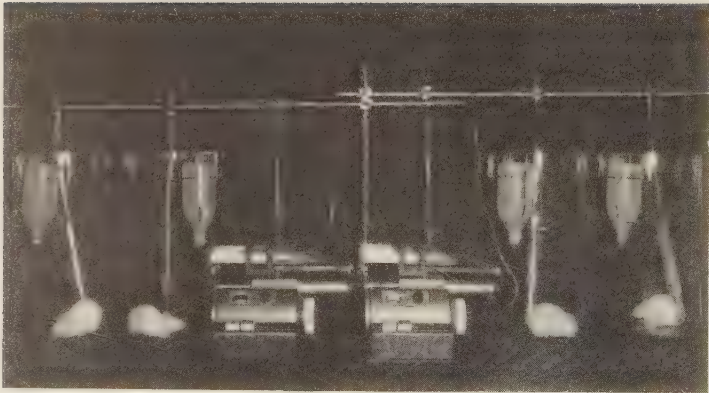


Abb. 2: Teil der Dauerinfusions-Anlage in Betrieb.

Herrn Schreyer (Werkstatt der Abteilung Embryonalpharmakologie)  
danke ich für die Herstellung der Zwischengelenke.

|    |                       |
|----|-----------------------|
| I  | 90                    |
|    | 60                    |
|    | 60                    |
|    | $m = 70 \pm 17 (3)$   |
| II | 570                   |
|    | 300                   |
|    | 320                   |
|    | 410                   |
|    | 200                   |
|    | 300                   |
|    | $m = 350 \pm 126 (7)$ |

Tab. 1: Einfluß von Chloramphenicol auf die Dauer der Hexobarbital-Narkose (Angaben in Minuten).

I: 100 mg Hexobarbital (Evipan)/kg i.p.

II: 100 mg Hexobarbital + gleichzeitig 100 mg Chloramphenicol/kg i.p.

m = Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

( ) = Zahl der Versuchstiere

p = 0.005

Als Narkoseende wurde das Aufrichten aus der Rückenlage gewählt.



Thiamphenicol (Urfamycin<sup>R</sup>) und Oxytetracyclin (Terramycin<sup>R</sup>) wurden in handelsüblicher Form in 12stündigem Abstand zweimal täglich subcutan injiziert. (Strukturformeln siehe Abb. 3).

## 2.8 Bestimmung der Chloramphenicolkonzentration \*

Chloramphenicol wurde mit einer nach VÖMEL und SPINGLER modifizierten Methode nach GLAZKO, WOLF und DILL chemisch bestimmt.

Prinzip: Nach Reduzierung der Nitrogruppe des Chloramphenicol zum primären Amin wird dieses nach der Diazotierungsmethode von BRATTON und MARSHALL kolorimetrisch bestimmt.

Für das aktive Antibiotikum war diese ursprüngliche Methode jedoch nicht spezifisch, da mikrobiologisch inaktive Abbauprodukte, die noch die Nitrogruppe enthalten, miterfaßt werden. Deshalb werden nach VÖMEL und SPINGLER durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel die wasserlöslichen Glucuronsäureester abgetrennt.

### Bestimmung:

#### 1. Extraktion:

3 ml Serum - oder Gewebshomogenat in einer Verdünnung von 1:40 - werden auf 30 ml mit Wasser verdünnt und dreimal mit 30 ml Essigsäureäthylester 3 Minuten extrahiert. Die Essigesterphasen werden vereinigt und auf ein geringes Volumen durch Destillation eingeeengt. Der Rest wird mit einem Ball bei Zimmertemperatur im Luftstrom zum Trocknen gebracht. Der trockene Rückstand wird in 1 ml Methanol gelöst, mit 4 ml Wasser verdünnt.

#### 2. Reduktion mit $\text{TiCl}_3$

3 ml dieser Lösung werden mit 1 ml  $\text{TiCl}_3$ -Lösung versetzt, um die Nitrogruppe zum primären Amin zu reduzieren. Nach 1 Minute werden 2 ml 1n NaOH zugegeben, um das überschüssige  $\text{TiCl}_3$  auszufällen. Nach zweiminütigem Abzentrifugieren werden 3 ml des Überstandes in ein 10 ml-Kölbchen gegeben und nach 8 Minuten zur Reacidifizierung mit 1 ml 4 n HCl versetzt.

---

Den Firmen Boehringer-Mannheim, Pfizer GmbH und Zambon S.A. möchte ich für die freundliche Bereitstellung der entsprechenden Präparate danken.

\* Den Herren Doktoren R.TIMMLER und KOCH danke ich für die Möglichkeit, die Methode im Labor der Fa. Boehringer-Mannheim zu erlernen.

### 3. Diazotierung

Dazu wurden nach 9 Minuten 1 ml 0,1%ige  $\text{NaNO}_2$  zugegeben. Durch Zusatz von 1 ml 0,5%iger Ammoniumsulfamatlösung wird der Nitritüberschuß eliminiert.

### 4. Kupplung

Dazu werden nach 17 Minuten 1 ml 0,5%iges Kupplungsreagens (N-Naphtyl-(1)- $\beta$ -äthylendiammoniumdichlorid) zugegeben, auf 10 ml mit Wasser verdünnt und die Extinktion nach genau 60 Minuten im Wasserbad von  $38^\circ\text{C}$  nach Abkühlung sofort bei 546 nm gemessen.

### 5. Auswertung

Durch Vergleich mit einem Testwert oder einer Eichkurve werden die Chloramphenicolkonzentrationen unter Berücksichtigung der Leerwerte der jeweils untersuchten Proben berechnet.

GLAZKO, WOLF und DILL konnten im Serum und in Gewebshomogenaten 90 bis 98% der zugegebenen Chloramphenicolmenge wiederauffinden. NEDDEN und Mitarbeiter haben kürzlich mit dieser Methode und mit der für das aktive Chloramphenicol streng spezifischen mikrobiologischen Methode zahlreiche Konzentrationsbestimmungen gleichzeitig durchgeführt. Über die Fehlerbreite hinausgehende Unterschiede konnten zwischen beiden Methoden nicht gefunden werden.

## 2.9 Teratologische Technik

Nach Dekapitation der schwangeren Ratten am Tag 20 wurde die Zahl der Resorptionen und lebenden Feten bestimmt. Letztere wurden nach dem Wiegen und makroskopischer Inspektion in 4% Formollösung fixiert. Nach 12stündiger Wässerung wurden die Feten mittels eines Bauchschnittes exenteriert und eine Woche lang in Äther-Alkohol-Lösung (1:3) entwässert. Nach eintägiger Wässerung und einwöchiger Aufhellung in 10% KOH wurden die Skelette mit Alizarin-Rot angefärbt. Wiederum nach eintägiger Wässerung wurden die Feten in eine Benzylalkohol-Glycerin-Alkohol-Lösung (1:2:2) gelegt und danach in Glycerin-Lösung endgültig aufbewahrt. Die Untersuchung auf Skelettmißbildungen erfolgte unter dem Stereomikroskop. Insbesondere geachtet wurde auf Mißbildungen der Schädel-, Extremitäten-, Wirbelkörper-, Rippen- und Hüftknochen.

## 2.10 Statistische Auswertung

Das Signifikanz-Niveau der Ergebnisse wurde jeweils mittels des t-Testes

geprüft (PÄTAU 1943). Zu den Rechnungen wurde das WANG Computing System 370 verwendet.

## 2.11 Messung der Atmung

Die Atmung der Embryonen wurde genau nach der von SPIELMANN und LÜCKE angegebenen Methode im Warburg-Gerät gemessen. Die Präparation erfolgte bei Raumtemperatur. Nach Einschnitten der Uteruswand wurden jeweils 2 Embryonen ohne Fruchtblase ("nackt") in ein Warburg-Gefäß gefüllt. Das Medium bestand aus Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung mit 0,1% Glucose und 0,01 mM HEPES-Puffer. Gemessen wurde in Sauerstoff und bei 37°C.

## 2.12 Hämatologische Untersuchungen

Die Zählung der Leukocyten und Erythrocyten im Blut wurde nach dem Coulter-Prinzip mit dem Gerät Model S der Fa. Coulter Electronics, England, durchgeführt. Zur Zählung der Lymphocyten im Differentialblutbild wurde die Färbung nach PAPPENHEIM verwendet.

Diese Untersuchungen wurden zusammen mit Herrn Professor Dr. H.-J. Kirstaedter von der Medizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin durchgeführt. Ihm sei dafür herzlich gedankt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Messung der Cytochromoxidaseaktivität mit der Sauerstoffelektrode

Die gestellten Aufgaben erforderten zahlreiche Bestimmungen der Cytochromoxidase-Aktivität. Deshalb wurde der - gegenüber der spektro-photometrischen Methode weniger aufwendigen - polarographischen Bestimmung mit der Sauerstoffelektrode der Vorzug gegeben.

Die Aktivität dieses Enzyms kann im Prinzip nach zwei Methoden bestimmt werden:

1. spektro-photometrisch durch Messen der Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme von reduziertem Cytochrom C:



oder

2. durch manometrische oder polarographische Messung des Sauerstoffverbrauchs in einem System, wo die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs eine Funktion der Aktivität der Cytochromoxidase ist:



#### Prinzip der Sauerstoffelektrode nach Clark (Abb. 4):

Ein Platindraht als Kathode (Pl) ist über eine halbgesättigte KCL-Lösung - sie verhindert ein Diffusionspotential - mit einem Silberdraht als Referenzelektrode (Ag) verbunden, und das Ganze ist durch eine sauerstoffdurchlässige Teflonmembran (M) gegen die sauerstoffhaltige Lösung abgegrenzt. Zwischen den beiden Elektroden wird eine Spannung angelegt. Der Strom ist in einem Spannungsbereich von 0,5 bis 0,8 mV konstant und eine Funktion des Sauerstoffgehalts der Lösung. Der gemessene Strom wird über einen Verstärker auf einem gebräuchlichen Schreiber registriert. Die Steilheit des Stromabfalls ist direkt proportional dem Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit. Bei den in der Regel verwendeten Kammervolumina von 1-3 ml wird die Diffusion des Sauerstoffs zur Membran hin zum limitierenden Faktor, so daß durch einen Magnetrührer (R) der Sauerstoffgehalt in allen Teilen der Kammer unter der Messung gleich gehalten werden muß. Die notwendige Drehgeschwindigkeit des Rührers muß in den Bereich gestellt werden, in dem der Ausschlag von einer bestimmten Umdrehungszahl nicht mehr beeinflußt wird. Seit 1955 findet die Clark-Elektrode vor allem Verwendung zur Messung der Atmung von Mitochondrien und Untersuchungen über die oxidative Phosphorylierung.

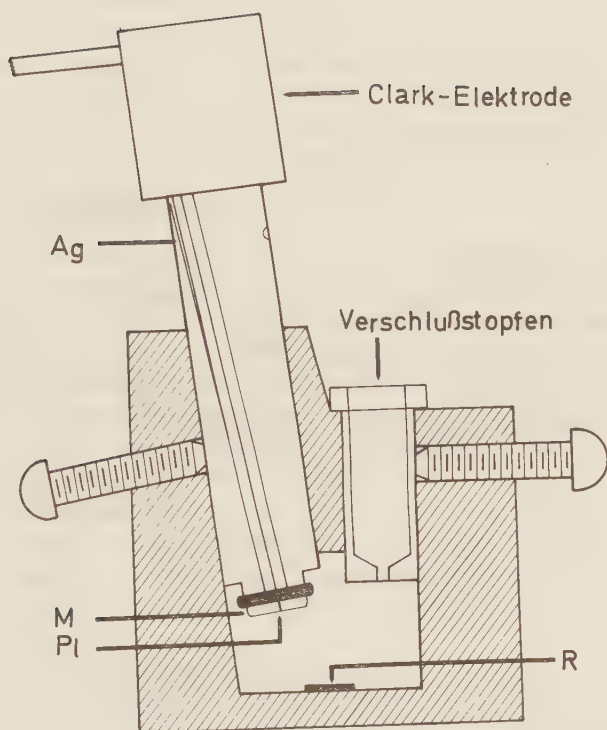


Abb. 4: Schematische Darstellung der Reaktionskammer mit Clark-Elektrode zur Messung des Sauerstoffverbrauchs (nach ESTABROOK). Erläuterungen im Text.

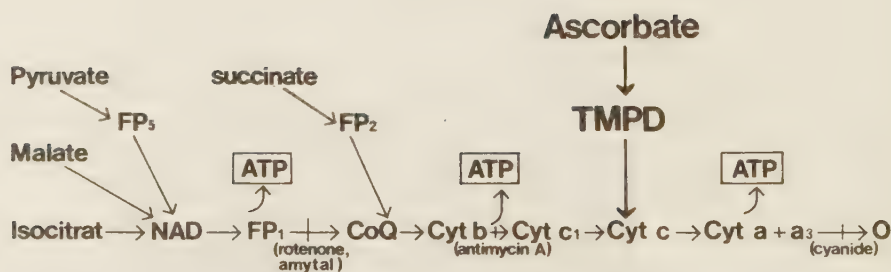


Abb. 5: Weg der Elektronenübertragung in der Atmungskette mit Darstellung des hier verwendeten Systems zur Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität (nach LEHNINGER; bzw. LEE, SOTTOCASA, ERNSTER).

In Klammern häufig verwendete Hemmstoffe der Elektronenübertragung mit ihren Angriffspunkten.

### Prinzip der polarographischen Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität

Die Cytochromoxidase (= WARBURG'sches Atmungsferment, Cytochrom  $a_3$ , E.C. 1.9.3.1) ist definiert als das Enzym, das reduziertes Cytochrom C durch molekularen Sauerstoff oxydiert.

Durch Zusatz von Na-Ascorbat, N,N,N',N'-Tetramethylparaphenylendiamin (TMPD) und Cytochrom C ist der Sauerstoffverbrauch des Gewebshomogenates abhängig von der Aktivität der Cytochromoxidase (Abb. 5). Ascorbat dient als geeignetes Reduktionsmittel, da es aufgrund seines Redoxpotentials Elektronen auf Cytochrom C überträgt (MINNAERT) und kein Anhalt für eine Reaktion seiner Oxidationsprodukte mit der Gesamtreaktion vorliegt; TMPD katalysiert diese Elektronenübertragung (SANADI, JACOBS).

Aber erst nach Zusatz von Detergentien waren SMITH und CAMERINO 1963 relativ reproduzierbare Aktivitätsbestimmungen an KEILIN-HARTREE-Partikeln gelungen. 1967 konnten SCHNAITMAN und GREENAWALT durch Verwendung von LUBROL, einem nicht-ionischen Detergens, hohe Aktivitäten der Cytochromoxidase in isolierten Mitochondrien und Leberhomogenat gut reproduzierbar bestimmen. Deshalb wurde von uns diese Methode gewählt.

Bislang ist nicht publiziert worden, ob sie den Anforderungen in Bezug auf Michaelis-Menten-Kinetik, Linearität zwischen Aktivität und Enzymkonzentration und Reproduzierbarkeit genügt. So war die Prüfung dieser Kriterien ein Hauptbestandteil des methodischen Teils dieser Arbeit. Im Licht dieser Ergebnisse sollen bislang wiederholt beschriebene Schwierigkeiten diskutiert werden.

### System von SCHNAITMAN, ERWIN und GREENAWALT

Eine 2 ml-Kammer mit Clark-Elektrode wird benutzt. Reaktionsmedium: 0,1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 0,2 mM TMPD, 11,6 mM Na-Ascorbat, 0,05 mM Cytochrom C (Typ III, Sigma Chemical Company), 5 - 50  $\mu\text{l}$  Homogenat entsprechend 20 - 80  $\mu\text{g}$  DNA. Temperatur: 25°C.

Das Homogenat wird vor der Zugabe 15 Minuten mit dem Detergens LUBROL WX in einer Konzentration von 18 - 54 mg/mg DNA entsprechend 0,3 - 1,0 mg/mg Protein inkubiert bei 0°C. Start der Reaktion mit Cytochrom C.

### Leerwert, Substratbindungskurve, $K_m$ -Wert

Um in dem System Reduktionsmittel  $\longrightarrow$  Cytochrom C  $\longrightarrow$  Cytochromoxidase  $\longrightarrow$   $\text{O}_2$  den Sauerstoffverbrauch nur in Abhängigkeit von der Cytochromoxidaseaktivität

zu messen, muß Cytochrom C während der gesamten Reaktionszeit in reduzierter Form im Überschuß vorliegen. Von den hierzu von SLATER geprüften Reduktionsmitteln Hydrochinon, p-Phenylendiamin, Adrenalin, Cystein und Ascorbinsäure erfüllt nur letzteres diese Forderung. Einen Sauerstoffverbrauch von Ascorbinsäurelösungen ohne Gegenwart von Enzymen konnten jedoch BARRON, DE MEIO und KLEMPERER 1935 feststellen. Diese sogenannte Autooxidation wird katalysiert durch Spuren von Kupferionen. 1945 berichtet BOREL, daß dieser Prozeß durch hohe Konzentrationen Cytochrom C beschleunigt wird. So ergaben sich bei zahlreichen Autoren Schwierigkeiten mit diesem System der Cytochromoxidasebestimmung (HERRMANN, BOSS und FRIEDEWALD; SLATER 1949; SCHNEIDER und POTTER; MINNAERT; SMITH und CAMERINO). 1954 wiesen LEHNINGER, UL HASSAN und SUDDUTH bei 2 von 3 kommerziellen Cytochrom-C-Präparaten eine entsprechende Autooxidation nach. Sie fordern deshalb von jedem Untersucher, die Cytochrom C-katalysierte Autooxidation der Ascorbinsäure routinemäßig für das jeweils verwendete Präparat zu prüfen. Während dieser Arbeit fand HILL 1970 eine "Cytochrom-C-katalysierte Oxidation von Ascorbat in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat und TMPD", in einem System also, das dem von SCHNAITMAN, ERWIN und GREENAWALT angegebenen weitgehend entspricht.

Zur Prüfung dieses Leerwertes ("Autooxidation") wurde in diesem System der Sauerstoffverbrauch ohne Enzym in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen Cytochrom C gemessen. Die in Tab. 3 dargestellten Ergebnisse zeigen bei hohen Cytochrom C-Konzentrationen einen erheblichen Sauerstoffverbrauch und bestätigen voll die Befunde der anderen Untersucher.

Nach diesem Nachweis eines "Reagentienleerwertes" muß noch geklärt werden, ob er zur Ermittlung der echten Enzymaktivität abgezogen werden muß. Deshalb wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substrat (=Cytochrom C)-Konzentration bei konstanter Enzymkonzentration gemessen und sowohl ohne als auch mit Leerwertkorrektur in Abb. 6 aufgetragen. Es soll hier betont werden, daß das Substrat der enzymatischen Reaktion nur Cytochrom C ist, nicht aber Ascorbat und TMPD. Die von letzteren katalysierte Übertragung von Elektronen auf Cytochrom C geschieht nicht-enzymatisch.

Diese "Substratbindungskurve" ähnelt einer Kurve, die der Summe zweier voneinander unabhängiger Funktionen entspricht. In diesem Falle würde der untere Teil dem Anfangsteil der üblichen hyperbolischen Substratbindungskurve entsprechen, während der weitere Verlauf im wesentlichen durch die

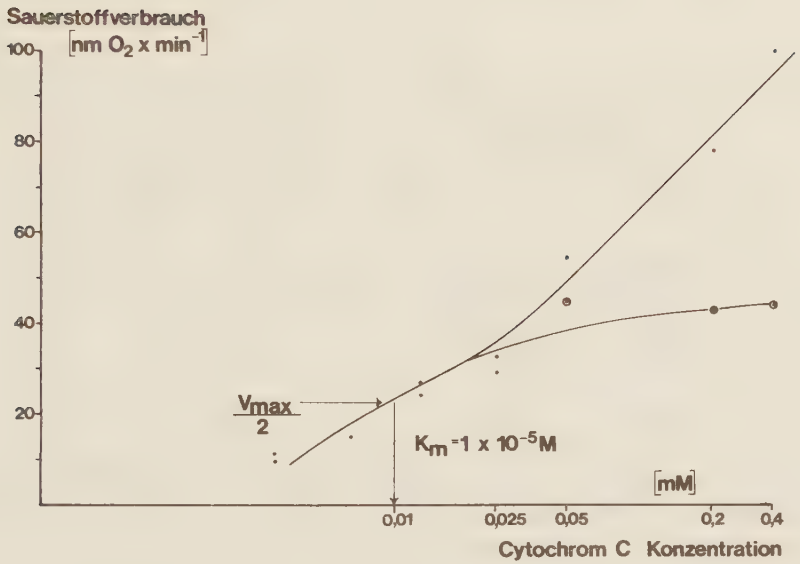


Abb.6 : Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (Sauerstoffverbrauch) von der Substrat (Cytochrom C -) - Konzentration ohne (•) und nach (●) Abzug des " Reagentienleerwertes" ( Tab. 3 ).

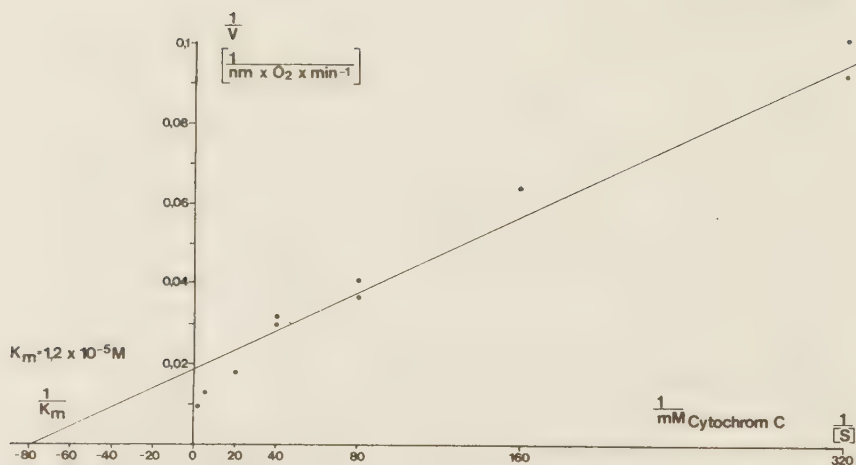


Abb. 7 : Werte der Substratbindungskurve aus Abb. 6 , aufgetragen  
im Diagramm nach Lineweaver und Burk.

| Ø Lubrol | 54 mg Lubrol WX/mg DNA |
|----------|------------------------|
| 27,56    | 61,9                   |

Tab. 2: Einfluß von Lubrol WX auf die Cytochromoxidaseaktivität ( $10^{-9}$  Mol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ /Kammer, Mittelwerte von Doppelbestimmungen).  
Standard-Reaktionsbedingungen wie auf Seite 19 angegeben.  
Enzymkonzentration 3,75  $\mu$ g DNA/Kammer (Leberhomogenat).

| Cyt.-C-Konz.<br>mM | Sauerstoffverbrauch<br>$\text{nm } O_2 \cdot \text{min}^{-1}$ |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|
| 0,05               | 9,8                                                           |
| 0,2                | 36,4                                                          |
| 0,4                | 56,7                                                          |

Tab. 3 : "Reagenzienwert": Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Cytochrom C-Konzentration ohne Enzym. Bedingungen sonst wie auf Seite 19 angegeben.

Abb. 10 bis 13 :

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Cytochromoxidase von der Enzymkonzentration für Homogenate verschiedener Organe der Ratte.

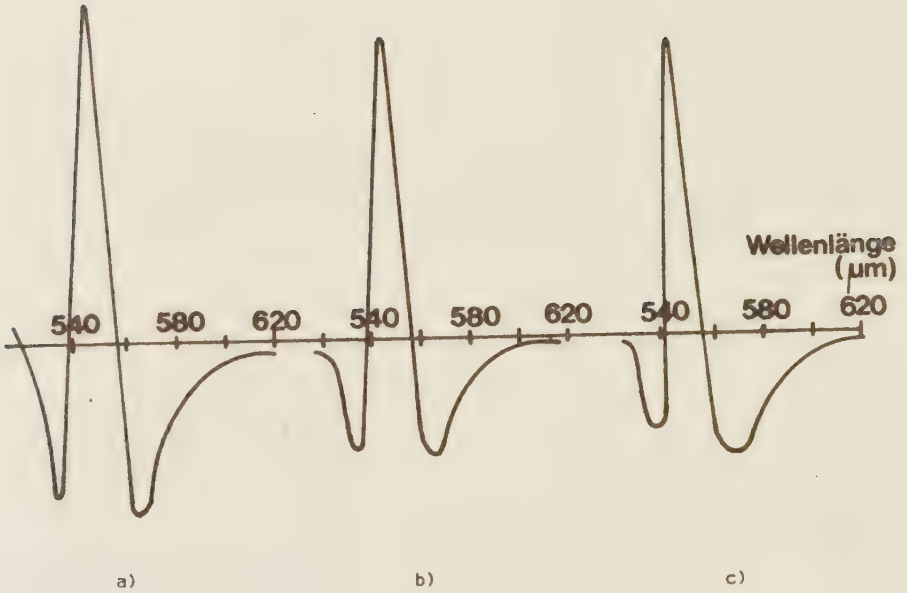


Abb. 9 : Differenzspektren von Cytochrom C ( 0.9 mg/ml ),  
reduziert minus oxidiert. Von links nach rechts:

- a) Boehringer Mannheim
- b) Sigma Chemical Co. Typ VI
- c) Sigma Chemical Co. Typ III

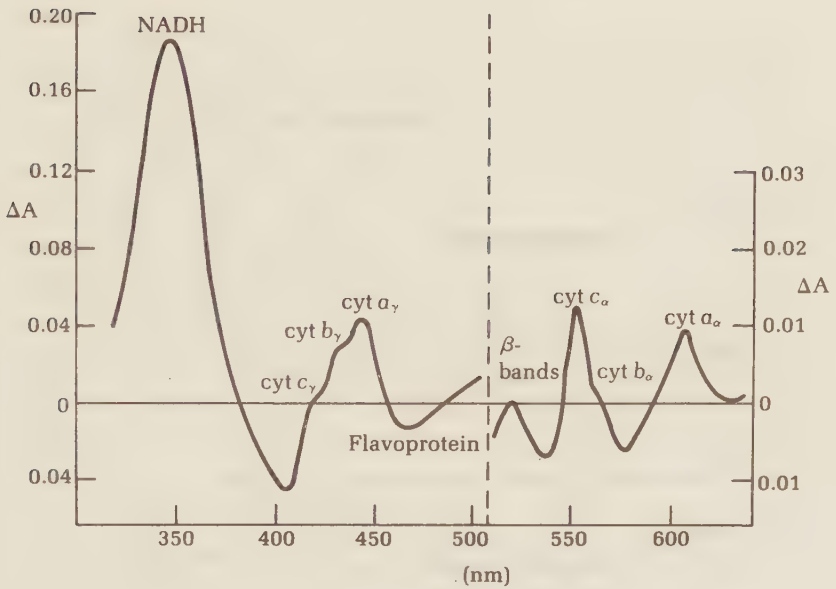


Abb. 8 : Differenzspektren der Atmungskettencytochrome von Rattenleber - Mitochondrien (nach LEHNINGER).

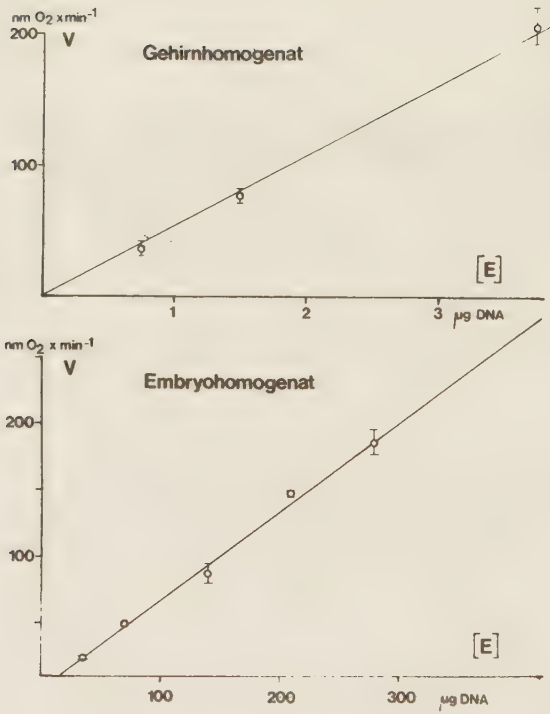


Abb. 10 und 11

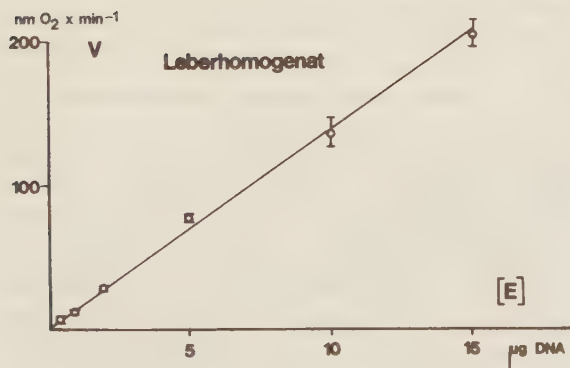
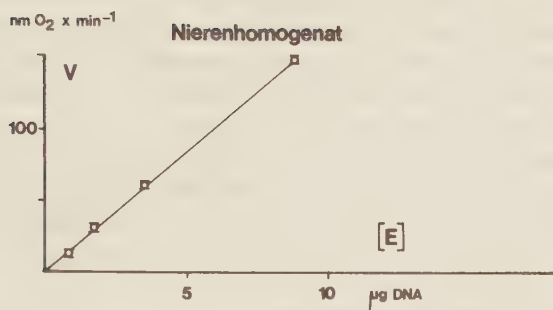


Abb. 12 und 13

Der Leerwert der Standardsubstratkonzentration von 0,5 mM beträgt ca.  $9,8 \cdot 10^{-9} \text{ MOL O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$  und damit nur 5-10% der bei den in der Regel verwendeten Enzymkonzentrationen erhaltenen Aktivitäten. Nach Abzug der Leerwerte der entsprechenden Cytochrom-C-Konzentrationen entspricht die Kurve dem üblichen hyperbolischen Verlauf einer Substratbindungskurve. Die Befunde aus der Abb. 6 weisen auf die Additivität des Leerwertes hin.

In Abb. 7 werden die Werte der Substratbindungskurve (Abb. 6) im Diagramm nach Lineweaver und Burk aufgetragen. Sie resultieren in einer Geraden, deren Schnittpunkt mit der Abszisse einen  $K_m$ -Wert von  $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ MOL}$  Cytochrom C ergibt.

#### Untersuchungen zur Ursache des Leerwertes

Folgende Befunde ließen vermuten, daß der Leerwert auf einer Verunreinigung der Cytochrom C-Präparation mit Cytochromoxidase beruht:

- Der Leerwert nimmt mit steigenden Cytochrom C-Konzentrationen zu

(TAB 3)

- Zusatz von Detergentien erhöht ihn (HILL)

Deshalb wurden zur Prüfung auf einen etwaigen Gehalt an Cytochromoxidase (=Cytochrom  $a_3$ ) von verschiedenen Cytochrom C-Präparaten die Differenzspektren geschrieben. In keinem Fall gaben sie ein für Cytochrom  $a_3$  kennzeichnendes Maximum im Bereich um 605 nm (Abb. 8,9). Für die Vermutung, daß die Ursache des Leerwertes in präparativ bedingten Verunreinigungen des Substrates mit Enzym zu suchen ist, ließ sich hiermit kein Hinweis finden. Da die nicht-enzymatische katalytische Wirkung von Hämin bei biologischen Oxidationen bekannt ist, untersuchten BARRON, DE MEIO und KLEMPERER die Wirkung geringer Konzentrationen (entsprechend  $0,15 \mu\text{M}$  Hämin) von Hämochromogenen (Verbindungen des Häms mit N-haltigen Basen oder denaturiertem Globin) auf den Sauerstoffverbrauch von Ascorbinsäurelösungen. Sie fanden einen gegenüber den Kontrollen (reine Ascorbinsäurelösung) beträchtlichen Sauerstoffverbrauch, insbesondere, je positiver das Redoxpotential des verwendeten Hämochromogens war. Es muß deshalb diskutiert werden, ob die katalytische Aktivität von Cytochrom C durch seine prosthetische Gruppe oder durch bei seiner Präparation entstandene Verbindungen von Häm mit denaturiertem Protein verursacht wird, zumal das Redoxpotential des Cytochrom C ( $E'_0$  für Cytochrom C = +0,26 Volt) noch wesentlich positiver als das der Hämochromogene ist. Die Erhöhung des Leerwertes durch Detergentien (HILL) ließe sich dadurch erklären, daß die prosthetische Gruppe des Cytochrom C tief im Proteinmolekül verborgen ist - es ist durch  $\text{KCN}^-$  oder CO nicht hemmbar -, so daß durch Veränderung der Tertiärstruktur durch Detergentien - allerdings ohne wesentliche Denaturierung der Kontakt zwischen

Ascorbat und prosthetischer Gruppe erleichtert wird.

#### Einfluß von LUBROL WX auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Der Zusatz des von SCHNAITMAN, ERWIN und GREENAWALT angegebenen nicht-ionischen Detergens LUBROL WX in Konzentrationen von 18 - 62 mg/mg DNA steigert die Cytochromoxidaseaktivität um 60% (Tab. 2). Dies stimmt überein mit der von JAVKOVCIC, HADDOCK, GETZ, RABINOWITZ und SWIFT gefundenen Aktivitätssteigerung bei der spektrophotometrischen Cytochromoxidasebestimmung. SMITH und CAMERINO vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen, daß Detergentien die enge räumliche - und damit auch funktionelle - Verknüpfung von Cytochrom a, a<sub>3</sub> und Cytochrom C unterbrechen. Dadurch oxydiert dann Cytochrom a, a<sub>3</sub> das lösliche Cytochrom C eher als das strukturgebundene, endogene.

#### Haltbarkeit des Enzyms

Nach Lagerung bei -18° C über mehrere Monate und nach viermaligem Einfrieren und Auftauen der Homogenate konnte kein Verlust an Cytochromoxidaseaktivität gefunden werden.

#### Ascorbat

Von großer Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der Aktivitätsbestimmung erwies sich die Frische der Na-Ascorbat-Lösung. Anfangs wurde eine schon länger gelagerte Substanz verwendet, und im Laufe eines Meßtages kam es zu Meßwertschwankungen um 30-100%. Nach Einsatz von frisch angesetzten Na-Ascorbat wurde für 2 - 3 Bestimmungen der erwartete Wert gemessen, bis es dann erneut zu einem Aktivitätsabfall kam. Durch Zusatz von EDTA zur Ausschaltung der Wirkung von Schwermetallionen und Verhinderung der - wie vermutet - dadurch katalysierten Ascorbat-Autoxidation konnte keine Besserung erzielt werden. Nach Verwendung frischer Substanz und Aufbewahren der Lösung während der Messung in einem dunklen, verschlossenen Zylinderschliffröhrchen bis zu 120 Minuten konnten jedoch einwandfrei reproduzierbare Werte erzielt werden, wenn zusätzlich folgende Kautelen berücksichtigt wurden:

#### Spülen der Kammer

Aus einem anderen Grund kam es im Laufe eines Meßtages zu einem fehlerhaften Meßwertabfall: Anfangs wurde die Kammer - und damit die Membran - nur mit destilliertem Wasser gespült. Nach mehreren Messungen konnte an der Membran deutlich ein roter Belag von - vermutlich - Cytochrom C beobachtet werden.

Durch mehrfaches Spülen mit halbgesättigter KCl-Lösung kann diese Fehlerquelle

eliminiert werden.

#### Prüfung der Linearität zwischen Enzymkonzentration und -aktivität

Da in dieser Arbeit zahlreiche quantitative Enzymbestimmungen vorgenommen werden sollten, mußte die Methode in einem bestimmten Bereich der Forderung nach einem linearen Verhältnis zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymkonzentration genügen. Die Abbildungen 10 - 13 stellen die Enzymaktivität als Funktion der Enzymkonzentration für Leber-, Nieren-, Gehirn- und Embryo-homogenat dar. Es ergibt sich ein lineares Verhältnis in einem Bereich von Enzymkonzentrationen, die sich mindestens um den Faktor 5 - 10 unterscheiden.

Bei den dargestellten Werten ist der Leerwert von  $9,8 \cdot 10^{-9}$  Mol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$  für die verwendete Cytochrom C-Konzentration von 0,05 mM bereits abgezogen. Die so ermittelten Geraden schneiden ausnahmslos den Nullpunkt, was die Additivität des Leerwertes erneut bestätigt. Sämtliche in dieser Arbeit angegebenen Cytochromoxidaseaktivitäten sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen bei einfacher und doppelter Enzymkonzentration.

#### Fehlerbreite

Zur Bestimmung der Fehlerbreite wurde aus 174 Einzelbestimmungen entsprechend 87 Doppelbestimmungen bei einfacher und doppelter Enzymkonzentration der Mittelwert beider Bestimmungen und die prozentuale Abweichung der Einzelwerte von diesem Mittelwert errechnet. Der Mittelwert von 5,4% dieser 87 prozentualen Abweichungen zuzüglich dessen Standardabweichung von 3,9% ergibt eine methodische Fehlerbreite von  $\pm 9,3\%$ . Unter der Berücksichtigung, daß es sich um eine enzymatische Bestimmung in Gewebshomogenaten handelt, ist dieser Wert tragbar.

#### Diskussion der Kinetik des Systems: Reduktionsmittel $\longrightarrow$ Cytochrom C $\longrightarrow$ Cytochromoxidase $\longrightarrow$ $O_2$

Noch 1963 berichteten SMITH und CAMERINO über erhebliche Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität:

1. "Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird nie erreicht, selbst nicht bei unendlich hohen Konzentrationen von Cytochrom C",
2. "gibt es keine eindeutige Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und dem Cytochromoxidasegehalt der Präparation" und
3. "beeinflusst sogar die Methode der Aufarbeitung die enzymatische Eigenschaften der Präparation".

Erst nach Vorbehandlung des biologischen Materials mit dem Detergens Na-Dodecylsulfat können statt "äußerst variabler Cytochromoxidaseaktivitäten" konstante maximale Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden. Eine andere Besonderheit der Reaktion bestand darin, daß die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur von der Cytochromoxidaseaktivität, sondern auch von der Konzentration des zugesetzten Cytochrom C abhing, so daß bei Messung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration kein Maximalwert erzielt wurde (STOTZ, ALTSCHUL und HOGNESS; SLATER; SMITH und CAMERINO; MINNAERT; WHARTON und GRIFFITHS). Diese Schwierigkeit mußte durch mehrere Messungen bei unterschiedlichem Substrat- und konstanter Enzymkonzentration mit nachfolgender Extrapolation auf unendlich hohe Cytochrom-C-Konzentrationen im Lineweaver-Burk Diagramm umgangen werden.

Die hier durchgeführten Untersuchungen mit der Methode nach SCHNAITMAN, ERWIN und GREENAWALT zeigen folgendes:

Der Sauerstoffverbrauch von Ascorbatlösungen nimmt mit steigenden Cytochrom-C-Konzentrationen zu. Wird der für jede Substratkonzentration gemessene Wert von den Enzymaktivitäten subtrahiert, resultiert die typische hyperbolische Substratbindungskurve, deren Werte im Lineweaver-Burk Diagramm eine Gerade ergibt. Die Reaktionsgeschwindigkeit steht über einen weiten Bereich in einem sehr guten linearen Verhältnis zur Enzymkonzentration in verschiedenen Gewebshomogenaten. Aufgrund der Ergebnisse von BARRON, DE MEIO und KLEMPERER und derjenigen von HILL wird angenommen, daß die prosthetische Gruppe des Cytochrom C die Ascorbatoxidation katalysiert. Eine entsprechende Wirkung von Cytochrom  $a$ ,  $a_3$  kann nicht ins Gewicht fallen, da Cytochrom C gegenüber Cytochrom  $a$ ,  $a_3$  weit im Überschuß vorliegt und selbst die Leerwerte für Cytochrom C bei der Standardsubstratkonzentration nur ca. 5 - 10% der bei den üblichen Enzymkonzentrationen gemessenen Aktivitäten beträgt. Im Gegensatz zu MINNAERT läßt sich kein Hinweis auf eine störende Interferenz der Ascorbinsäure mit der Cytochromoxidase finden. Es wird angenommen, daß diese von den anderen Autoren beschriebenen Schwierigkeiten hier durch die Einführung des nicht-ionischen Detergens LUBROL WX gelöst worden sind. Denn MINNAERT selbst führt an, daß die damaligen Schwierigkeiten eventuell mit der Annahme einer Diffusion des exogenen, relativ hochmolekularen Substrates Cytochrom C zum strukturgebundenen Enzym als limitierender Faktor zu erklären seien.

Die Aktivitätssteigerungen durch das nicht-ionische Detergens LUBROL WX der Cytochrom C - katalysierten Ascorbatoxidation bzw. der Enzymaktivität können folgende Ursachen haben:

1. Das Detergens denaturiert zum Teil das Cytochrom C zu Hämochromogenen, die in sehr niedrigen Konzentrationen die Ascorbatoxidation katalysieren.
2. Das Detergens verändert die Cytochrom-C-Struktur so, daß seine katalytische Aktivität nicht beeinträchtigt, die prosthetische Gruppe für Ascorbat aber zugänglicher wird.
3. Die Struktur der Mitochondrienmembran wird "aufgelockert", so daß exogenes, reduziertes Cytochrom C der an der inneren Membran lokalisierten Cytochromoxidase zur Oxidation zugänglich wird.

#### Zusammenfassende Beurteilung der Methode

Die von SCHNAITMAN, ERWIN und GREENAWALT angegebene Methode zur polarographischen Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität ermöglicht auf einfache Weise reproduzierbare Bestimmungen. Man erhält bei Auftragen der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration den typischen hyperbolischen Kurvenverlauf. Das Auftragen dieser Werte im Diagramm nach LINEWEAVER und BURK ergibt eine Gerade und einen  $K_m$ -Wert von  $10^{-5}$  Mol/Liter. Für die Homogenate von Leber, Nieren, Gehirn und Embryonen ergibt sich über einen weiten Bereich ein lineares Verhältnis zwischen Enzymaktivität und Enzymkonzentrationen. Mit der Substratkonzentration von 0,05 mM Cytochrom C ist das System nahezu gesättigt. Die methodische Fehlerbreite beträgt 9%. Folgende Kautelen müssen beachtet werden:

- . Zur Ermittlung der wahren Enzymaktivität muß der Reagentienleerwert der entsprechenden Cytochrom-C-Konzentration abgezogen werden.
- . Nach jeder Messung muß die Kammer und damit die Membran mehrere Minuten mit halbgesättigter KCl-Lösung gespült werden.
- . Als Reduktionsmittel ist nur frisch angesetzte Na-Ascorbatlösung zu verwenden. Sie muß während der Messungen in einem dunklen, verschlossenen Zylinderschliff Röhrchen aufbewahrt werden und ist spätestens nach 120 Minuten zu erneuern.

### 3.2 Untersuchungen über den Einfluß von Antibiotika auf Cytochromoxidase-Aktivität und Wachstumsvorgänge

#### 3.2.1 Regenerierende Leber

Um die Brauchbarkeit der Dauerinfusionsmethode an einem Modell mit bekannten Ergebnissen zu testen, wurden die Versuche der Arbeitsgruppen um LINNANE und KROON an regenerierender Leber wiederholt (DE VRIES und KROON, FIRKIN und LINNANE).

Tab. 4 zeigt Leberfeuchtgewicht, Gesamt-DNA-Gehalt der Leber und Cytochromoxidaseaktivität bei folgenden Behandlungsgruppen:

Unbehandelte Tiere ohne Hepatektomie ("Ø"); unbehandelte, scheinoperierte ("schein-op."); unbehandelte nach partieller Hepatektomie ("p.Hep.Ø"); partielle Hepatektomie und intravenöse Dauerinfusion von isotoner NaCl-Lösung ("p.Hep. NaCl-Di"); partielle Hepatektomie mit intravenöser Dauerinfusion von 1000 mg Chloramphenicol bzw. 200 und 70 mg Oxytetracyclin subcutan in zwei täglichen Einzeldosen/kg Körpergewicht und Tag von der 24. bis zur 72. Stunde post operationem ("p.Hep.-CAP" bzw. "OTC<sub>70</sub>" und "OTC<sub>200</sub>").

Weder die Infusion isotoner Succinat-NaCl-Lösung noch die Applikation beider Antibiotika beeinträchtigen das Leberfeuchtgewicht oder den Gesamt-DNA-Gehalt der Leber. Es ergibt sich keinerlei Anhalt, daß Chloramphenicol oder Oxytetracyclin in diesen Dosen nennenswert die Nukleinsäuresynthese oder die mikrosomale Proteinsynthese hemmen, was sich sonst in einer Minderung des Gesamtwachstums oder des DNA-Gehalts der Leber auswirken sollte. Die Hemmung des typischen mitochondrialen, membrangebundenen Enzyms Cytochromoxidase um 43% zeigt dagegen, daß beide Antibiotika die mitochondriale Proteinsynthese in-vivo fast vollständig blockieren. Wie aus Tab. 5 hervorgeht, nimmt das Leberfeuchtgewicht 72 Std. nach partieller Hepatektomie um 52% ab, die Cytochromoxidase-Synthese wird durch die Chloramphenicolinfusion in diesem Zeitraum um 43% gehemmt, was einer fast vollständigen Hemmung der de-novo-Synthese entspricht.

Der gleiche Effekt wird mit 200 mg Oxytetracyclin/kg und Tag erzielt, und auch mit 70 mg/kg und Tag ist die Hemmung noch deutlich: Die bei dieser Dosis geringere Wirkung dürfte darauf zurückzuführen sein, daß in diesem

| Behandlung                       | Anzahl der Versuchstiere | Leberfeuchtgewicht 1) | DNA-Gehalt der Leber 2) | Cytochromoxidaseaktivität/DNA 3) | % Hemmung |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------|
| ∅                                | 5                        | 5,94 ± 0,67           | -                       | 16,9 ± 2,77                      | -         |
| Scheinoperierte                  | 4                        | -                     | -                       | 15,43 ± 2,13                     | -         |
| p. Hepatektomie ∅                | 6                        | 5,15 ± 0,47           | 16,46 ± 2,38            | 14,07 ± 1,26                     | -         |
| p.Hepat.-NaCl-Dauerinfusion (DI) | 4                        | -                     | -                       | 14,33 ± 0,82                     | 0 %       |
| p.Hep. CAP-DI                    | 5                        | 5,56 ± 0,22           | 16,24 ± 0,92            | 8,17 ± 0,82<br>p < 0.0002        | 43        |
| p.Hep. OTC <sub>70</sub> s.c.    | 4                        | 5,14 ± 0,15           | 17,51 ± 1,79            | 10,75 ± 0,56<br>p < 0.001        | 25        |
| p.Hep. OTC <sub>200</sub> s.c.   | 5                        | 5,03 ± 0,56           | 16,51 ± 1,36            | 8,72 ± 0,75<br>p < 0.0002        | 39        |

1) in g

2) in mg/Leber

3) in nMol O<sub>2</sub> · min<sup>-1</sup> · µg DNA<sup>-1</sup>

Tab. 4 : Der Einfluß von Chloramphenicol (CAP, 1000 mg/kg/Tag) und Oxytetracyclin (OTC 70 bzw. 200 mg/kg/Tag s.c. in zwei täglichen Einzeldosen) (24. bis 72. Stunde post operationem) auf Leberfeuchtgewicht, GesamtdNA-Gehalt und spezifische Cytochromoxidase 72<sup>h</sup> nach partieller Hepatektomie

Fall die Oxytetracyclinkonzentration nicht während des gesamten Behandlungszeitraumes hoch genug war, um in den Mitochondrien die Proteinsynthese zu blockieren.

|                      |                        |                          |                        |
|----------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Gesamtleber prae op. | $5,94 \pm 0,9 = 100\%$ | Regenerierte Gesamtleber | $5,15 \pm 0,8 = 100\%$ |
| - excidiertes Gewebe | $3,51 \pm 0,7 = 60\%$  | - Restleber              | $2,43 \pm 0,5 = 48\%$  |
| = Restleber          | $2,43 \pm 0,7 = 40\%$  | = Leber-Zuwachs          | $2,72 \pm 0,7 = 52\%$  |

Tab. 5 : Leber-Gewichte vor, während und 72 Stunden nach partieller Hepatektomie.  
Mittelwerte des jeweiligen Feuchtgewichtes von 6 Tieren.

|                        | Tag 11 | Tag 12     | Tag 13      | Tag 14     |
|------------------------|--------|------------|-------------|------------|
| Cytox/E <sup>1</sup>   | 14     | 115 ± 20   | 240 ± 39    | 645 ± 108  |
| µg DNA/E               | 12,3   | 107 ± 10   | 306 ± 14    | 675 ± 101  |
| Cytox/DNA <sup>2</sup> | 1,13   | 1,07 ± 0,2 | 0,78 ± 0,03 | 0,94 ± 0,1 |
| n                      | 1      | 6          | 2           | 19         |
| E                      | 69     | 112        | 38          | 76         |

1) nMol O<sub>2</sub> · min<sup>-1</sup>/Embryo

2) nMol O<sub>2</sub> · min<sup>-1</sup> · DNA<sup>-1</sup>

**Tab. 6 :** Cytochromoxidaseaktivität/Embryo (Cyttox/E), DNA-Gehalt/Embryo (DNA/E) und spezifische Cytochromoxidaseaktivität (Cyttox/DNA) in der Phase der Organogenese (Rattenembryo)  
 n = Anzahl der Enzympräparationen  
 E = Gesamtzahl der untersuchten Embryonen

Daß trotz 24-stündiger Pause zwischen partieller Hepatektomie und Antibioticabehandlung die de-novo-Synthese der Cytochromoxidase fast vollständig gehemmt wird, steht in Einklang mit den bisherigen Beobachtungen, daß die Gewichtszunahme in den ersten 24 Std. nach partieller Hepatektomie hauptsächlich auf einer Zunahme an Lipoiden und Flüssigkeiten beruht (PCLLAK), während der Hauptwachstumsschub zwischen der 24. und 48. Stunde erfolgt.

Da Chloramphenicol vor allem bei der Ratte in der Leber metabolisiert und nachfolgend sehr schnell eliminiert wird, mußten CLARK-WALKER und LINNANE bzw. De VRIES und KROON Chloramphenicol entweder alle 6 Std. intravenös injizieren oder es in einer subcutan verpflanzten Dialysekapsel applizieren. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die intravenöse Dauerinfusion in diesem Fall sehr gut geeignet ist, die für eine Hemmung

der mitochondrialen Proteinsynthese erforderlichen Serum- und Gewebekonzentrationen von Chloramphenicol permanent aufrecht zu erhalten.

Da es trotz der ca. 50%igen Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität zu keiner Proliferationseinschränkung kommt, untersuchten FIRKIN und LINNANE die Succinat- und Pyruvat plus Malat-stimulierte Atmung isolierter Mitochondrien von chloramphenicol-behandelter regenerierender Leber; wie vermutet, fanden sie keine Verminderung der Atmung. Dies kann durch die Beobachtung von CHANCE erklärt werden, daß die turnover number der Cytochromoxidase beträchtlich größer ist als es für den "Zustand 4" ("aktiver Zustand" = maximale  $O_2$ -Aufnahme) der Atmung in isolierten Mitochondrien erforderlich ist.

Wenn nun Gewebe über mehrere Mitosen unter Chloramphenicol wächst, müßte die Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität stärker sein und von einem bestimmten Grad an zu einer Einschränkung der Atmung und dann möglicherweise auch der Proliferation führen. Hierbei muß aber berücksichtigt werden, daß die einzelnen Organe eine unterschiedliche Cytochromoxidaseaktivität pro Zelle aufweisen können und sich bei solchen mit geringerer spezifischer Aktivität eine Einschränkung des Cytochromoxidasegehalts eher hemmend auf Proliferation und sonstige ATP-abhängige Leistungen auswirken kann als in solchen mit hoher Aktivität. Abb. 14 zeigt, daß die spezifische Cytochromoxidaseaktivität verschiedener Gewebe beträchtlich variiert.

### 3.2.2 Embryonen-Cytochromoxidase

Die Cytochromoxidaseaktivität/Embryo steigt von Tag 11 bis 14 um einen Faktor von ca. 40, der DNA-Gehalt/Embryo um ca. das 60-fache, so daß die Cytochromoxidaseaktivität/DNA von 1,13 auf  $0,9 \text{ nMol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{DNA}^{-1}$  absinkt (Tab. 6 ).

Zwei verschiedene Arten von Experimenten mit 48stündiger Chloramphenicol-infusion wurden durchgeführt: Die Tiere wurden entweder von Tag 12 bis 14 oder von 10 bis 12 behandelt.

Einen Unterschied in Cytochromoxidaseaktivität und DNA-Gehalt der Embryonen zwischen den unbehandelten Kontrollen und den mit isotoner Succinat-NaCl-Lösung infundierten Tieren läßt Tab.7 nicht erkennen.

Die 48-stündige intravenöse Dauerinfusion von 1000 mg Chloramphenicol/kg und Tag von Tag 12 bis 14 mindert die Cytochromoxidaseaktivität/Embryo um

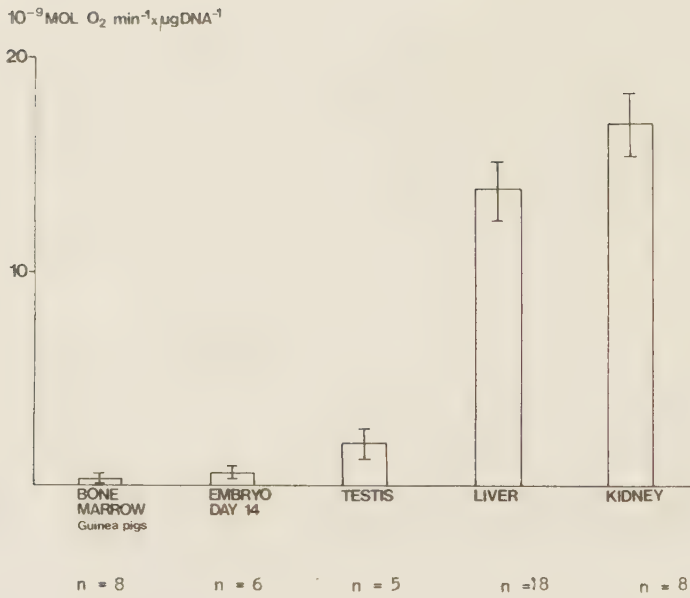


Abb. 14: Cytochromoxidase-Aktivität in proliferierenden und nicht proliferierenden Rattengeweben.

|                | n | E   | Cytox/E       | DNA/E         | Cytox/DNA       |
|----------------|---|-----|---------------|---------------|-----------------|
| NaCl DI        | 4 | 37  | 773 $\pm$ 121 | 732 $\pm$ 121 | 1,06 $\pm$ 0,04 |
| KO $\emptyset$ | 9 | 135 | 662 $\pm$ 82  | 648 $\pm$ 92  | 1,02 $\pm$ 0,05 |

Tab. 7 : Einfluß einer 48-stündigen Dauerinfusion (von Tag 12 bis 14) mit einer isotonen Succinat-NaCl-Lösung (NaCl-DI) auf Cytochromoxidaseaktivität/Embryo, DNA/Embryo und spezifische Cytochromoxidaseaktivität.

Einheiten wie in Tab.

n = Anzahl der Enzympräparationen

E = Gesamtzahl der untersuchten Embryonen

KO = Kontrollen ohne jegliche Behandlung

50%, während der DNA-Gehalt/Embryo nicht signifikant erniedrigt ist. Die Wirkung ist deutlich und statistisch hoch signifikant (Tab. 8 ).

Aber trotz intravenöser Dauerinfusion einer hohen Dosis Chloramphenicol ist die Wirkung geringer als erwartet: Die Cytochromoxidaseaktivität/Embryo nimmt normalerweise von Tag 12 (Behandlungsbeginn) bis Tag 14 um ca. das 6-fache zu, so daß eine vollständige Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese über diesen Zeitraum zu einer Reduzierung der Enzymaktivität/Embryo um über 80% hätte führen müssen. Es lag die Vermutung nahe, daß die Chloramphenicolkonzentration im Embryo nicht während der gesamten Behandlungszeit über 10 bis 20  $\mu$ g/ml Serum lag, wie es nach den Untersuchungen von FIRKIN und LINNANE bzw. De VRIES und KROON für die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese in-vivo erforderlich ist.

Deshalb wurde bei diesem Experiment (1000 mg Chloramphenicol/kg und Tag von Tag 12 bis 14) die Konzentration von "aktivem" Chloramphenicol im Embryohomogenat gemessen. Es zeigt Abb. 15, daß tatsächlich die Chloramphenicolkonzentration unter permanenter Dauerinfusion im Embryo bereits nach 24 Stunden das für die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese erforderliche Niveau unterschritten hat.

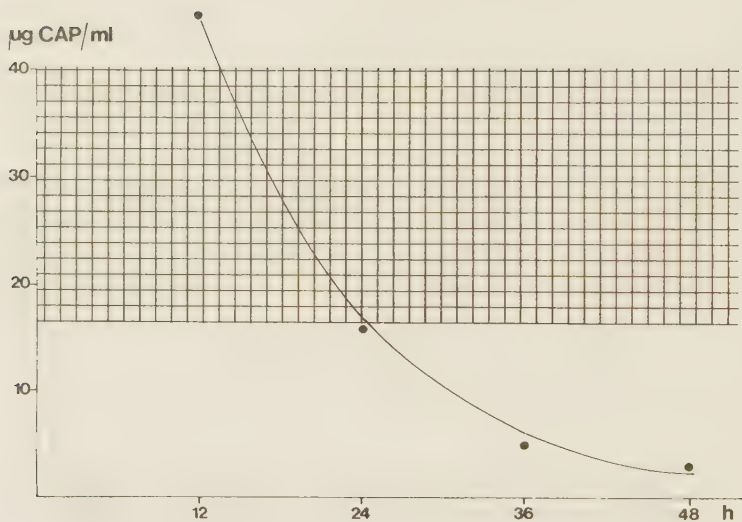


Abb.15 : Konzentration von aktiven Chloramphenicol im Homogenat von Rattenembryonen während 48stündiger intravenöser Dauerinfusion ( Tag 12 - 14). Das schraffierte Feld zeigt den Konzentrationsbereich, der zur Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese erforderlich ist.

|                      | n  | E   | Cytox<br>Embryo | %<br>Hem-<br>mung | DNA<br>Embryo | %<br>Hem-<br>mung | Cytox<br>Embryo | %<br>Hem-<br>mung |
|----------------------|----|-----|-----------------|-------------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| Kontrollen<br>Tag 14 | 13 | 172 | 676 ± 108       | -                 | 693 ± 107     | -                 | 0,98 ± 0,11     | -                 |
| CAP-DI<br>Tag 12-14  | 13 | 74  | 299 ± 135       | 56%               | 630 ± 95,5    | 10%               | 0,46 ± 0,16     | 54%               |
| p                    |    |     | < 0,0002        |                   | > 0,05        |                   | < 0,0002        |                   |
| Kontrollen<br>Tag 12 | 3  | 36  | 117 ± 20        | -                 | 110 ± 17      | -                 | 1,06 ± 0,04     | -                 |
| CAP-DI<br>Tag 10-12  | 4  | 39  | 55,8 ± 9,4      | 53%               | 84,4 ± 7,9    | 24%               | 0,66 ± 0,07     | 38%               |
| p                    |    |     | < 0,0027        |                   | < 0,05        |                   | < 0,0002        |                   |

Tab. 8 : Einfluß einer 48-stündigen Dauerinfusion von 1000 mg Chloramphenicol/kg und Tag (CAP-DI) von Tag 10-12 (unten) und 12-14 (oben) auf Cytochromoxidaseaktivität/Embryo, DNA/Embryo und spezifische Cytochromoxidaseaktivität.

Einheiten wie in Tab.

n = Zahl der Enzympräparationen

E = Gesamtzahl der untersuchten Embryonen

Cytox =  $\text{nMol O}_2 \cdot \text{min}^{-1}$

DNA =  $\mu\text{g/Embryo}$

Deshalb wurden - wiederum unter den gleichen Bedingungen: Dauerinfusion von 1000 mg Chloramphenicol/kg und Tag - die Cytochromoxidaseaktivität und DNA-Gehalt im Embryo nach 24 Stunden Behandlung, am Tag 13 also, gemessen (Tab. 9).

Die Cytochromoxidaseaktivität ist um 50% erniedrigt, bei vollständiger Hemmung von Tag 12 an müßte sie wesentlich deutlicher verringert sein, so daß wahrscheinlich die Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese etwas eher aufhört. Der DNA-Gehalt/Embryo ist um 20% erniedrigt, dieses Defizit wird bis zum Tag 14 so weit aufgeholt, daß dann kein signifikanter Unter-

|            | n | E  | Cytox/E      | $\frac{\mu}{\text{Hem-}}$<br>mung | DNA/E        | $\frac{\%}{\text{Hem-}}$<br>mung | Cytox/DNA    | $\frac{\%}{\text{Hem-}}$<br>mung |
|------------|---|----|--------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|----------------------------------|
| Kontrollen | 2 | 38 | 240 $\pm$ 39 | -                                 | 306 $\pm$ 14 | -                                | 0,78 $\pm$ 9 | -                                |
| CAP-DI     | 2 | 33 | 123 $\pm$ 3  | 51%                               | 246 $\pm$ 24 | 20%                              | 0,50 $\pm$ 5 | 36%                              |

Tab. 9 : Einfluß einer 24-stündigen Dauerinfusion von 1000 mg Chloramphenicol/kg und Tag von Tag 12-13 auf Cytochromoxidaseaktivität/Embryo, DNA-Gehalt/Embryo und spezifische Cytochromoxidaseaktivität. Bezeichnungen und Einheiten wie in Tab. 6

schied gegenüber den Kontrollen mehr gemessen wird, während das am Tag 13 ja auch größere Defizit an Cytochromoxidase am Tag 14 erst zur Hälfte aufgeholt ist. Dies kann so interpretiert werden, daß es durch Chloramphenicol in den ersten 24 Stunden Behandlung zu einer so starken Hemmung der Cytochromoxidase-Synthese - und damit Aktivität kommt, daß Atmung und Wachstum als Folge eingeschränkt werden. Nach Wiederaufnahme der Cytochromoxidase-Synthese wird der für die Atmungseinschränkung entscheidende geschwindigkeitsbegrenzende Bereich, der wahrscheinlich sehr niedrigen Cytox-Wert/Zelle entspricht, sehr bald überschritten, so daß Atmung und Proliferation schneller als die Cytox die Kontrollwerte erreichen können.

Die Versuche über den Einfluß von Chloramphenicol auf die Cytochromoxidaseaktivität und das Wachstum embryonalen Gewebes demonstrieren, daß das Antibioticum, bei der Ratte in hohen Dosen intravenös infundiert, die Synthese dieses membrangebundenen mitochondrialen Enzyms hemmt und in der Folge das Wachstum des Embryos einschränkt. Embryonales Gewebe verhält sich damit deutlich anders als Leber-Gewebe nach partieller Hepatektomie.

#### Einfluß von Thiamphenicol

Nicht ein bei verschiedenen Spezies unterschiedlicher Wirkungsmechanismus, wie von FLENER und REMMELE vermutet, sondern die sehr schnelle Elimination des Chloramphenicol erforderte bei der Ratte Dosen, die den human-therapeutischen Bereich (20-30 mg/kg und Tag) weit überschritten. Selbst damit aber ist die erwartete Wirkung - permanente Hemmung der Cytochromoxidase-Synthese - nur während eines Teils des Versuchszeitraums zu erzielen.

|                    | n | E  | Cytox/E      | %<br>Hem-<br>mung | DNA/E         | %<br>Hem-<br>mung | Cytox/DNA     | %<br>Hem-<br>mung |
|--------------------|---|----|--------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| Kontrollen         | 2 | 32 | 73,9 ± 2,6   | -                 | 112,3 ± 15,06 | -                 | 0,665 ± 0,10  | -                 |
| TAP <sub>10</sub>  | 4 | 64 | 48,8 ± 7,65  | 34%               | 111,2 ± 0,8   | 0%                | 0,439 ± 0,068 | 34%               |
| TAP <sub>30</sub>  | 2 | 46 | 26,13 ± 1,9  | 65%               | 86,93 ± 9,7   | 23%               | 0,300 ± 0,01  | 55%               |
| TAP <sub>100</sub> | 4 | 64 | 8,9 ± 2,92   | 88%               | 76,0 ± 3,4    | 33%               | 0,112 ± 0,039 | 84%               |
| TAP <sub>300</sub> | 3 | 48 | 1,21 ± 0,325 | 98%               | 57,16 ± 1,04  | 50%               | 0,021 ± 0,006 | 97%               |

Tab. 10 : Einfluß von 10, 30, 100 und 300 mg Thiamphenicol/kg s.c. und Tag (= TAP<sub>10</sub>, 30, 100, 300) von Tag 10-12 auf Cytochromoxidaseaktivität und DNA-Gehalt/Embryo und spezifische Cytochromoxidaseaktivität. Bezeichnungen wie in Tab. 6

Deshalb wurde das Methylsulfonyl-Derivat des Chloramphenicol, Thiamphenicol, für die gleichen Versuche eingesetzt. Sein Wirkungsprinzip ist mit demjenigen des Chloramphenicol identisch, seine Serumhalbwertszeit länger, insbesondere aber fällt seine Konzentration in den Organen wesentlich langsamer ab als die des Chloramphenicols (Mc CHESNEY et al.).

Abb. 16 demonstriert, daß Thiamphenicol, von Tag 12 bis 14 subcutan in zwei täglichen Einzeldosen injiziert, in wesentlich geringeren Dosen die Cytochromoxidase-Synthese hemmt: Bereits im therapeutischen Bereich (30 mg/kg und Tag) ist die Enzymaktivität um 25% vermindert, mit der Dosis von 1000 mg/kg und Tag ist die Cytochromoxidaseaktivität um 90% gehemmt, sie entspricht derjenigen am Tag 12. Diese Dosis reicht also aus, in embryonalem Gewebe die mitochondriale Proteinsynthese sofort und vollständig zu hemmen. Schon eine relativ geringe Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität führt offenbar zu einer Wachstumseinschränkung von 12%; ist die Enzymaktivität/E um 90% gemindert, ist das Feuchtgewicht der Embryonen um 32% reduziert.

Wird Thiamphenicol in verschiedenen Dosen von Tag 10 bis 12 gegeben (Tab. 10), ist, entsprechend der noch höheren Wachstumsrate (KÖHLER 1971), <sup>ist</sup> die Wirkung

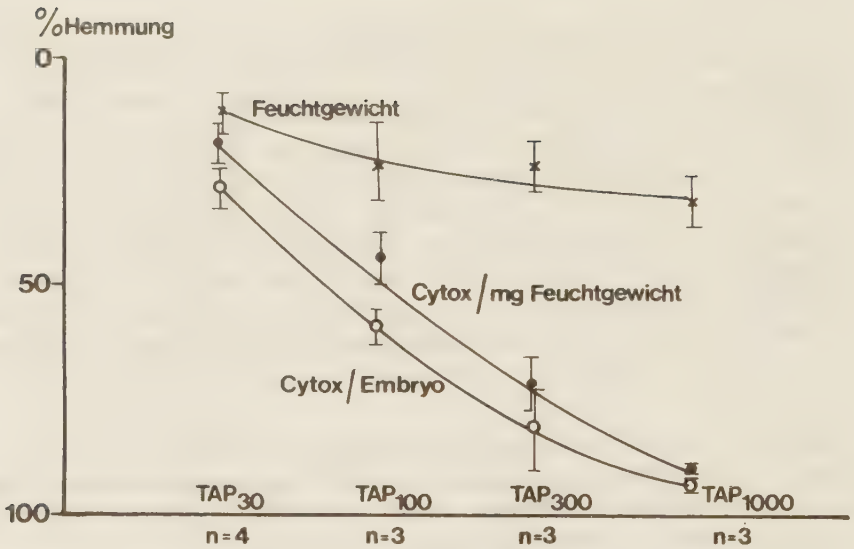


Abb.16 : Einfluß der Behandlung mit 30, 100, 300 und 1000 mg Thiamphicol/kg und Tag (= TAP<sub>30,100, 300, 1000</sub>) von Tag 12 bis 14 auf das durchschnittliche Feuchtgewicht der Embryonen, spez. Cytochromoxidaseaktivität und Cytochromoxidase/Embryo. Bezeichnung wie in Tab.6. Die Angaben in der Ordinate beziehen sich auf die jeweilige prozentuale Hemmung gegenüber den Kontrollen. Die senkrechten Striche stellen die Standardabweichung dar.

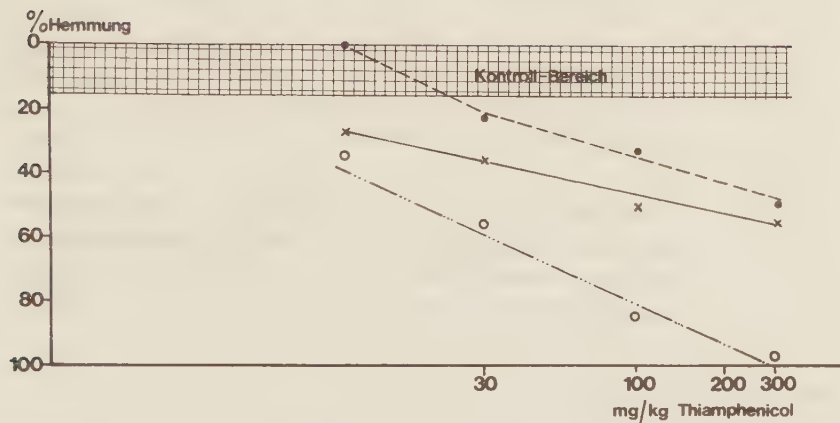


Abb. 17 : Zusammenfassende Darstellung des Einflusses einer 48stündigen Thiamphenicol-Behandlung von Tag 10 - 12 auf Cytochromoxidase-Aktivität / DNA, DNA Synthese und Atmung ( $QO_2$ ).

- % Hemmung der Atmung ( $QO_2$ ) (Daten von Tab. 12)
- % Hemmung der Cyt.ox./DNA (Daten von Tab. 10)
- % Hemmung der DNA-Synthese (Daten von Tab. 10)

|            | n | E  | Cytox/E  | %<br>Hem-<br>mung | DNA/E    | %<br>Hem-<br>mung | Cytox/DNA   | %<br>Hem-<br>mung |
|------------|---|----|----------|-------------------|----------|-------------------|-------------|-------------------|
| Kontrollen | 4 | 25 | 457 ± 23 | -                 | 869 ± 69 | -                 | 0,53 ± 0,04 | -                 |
| OTC        | 3 | 18 | 228 ± 8  | 50%               | 620 ± 53 | 28%               | 0,37 ± 0,06 | 30%               |
| p          |   |    | < 0,0002 |                   | < 0,0027 |                   | < 0,01      |                   |

Tab. 11 : Einfluß von 100 mg Oxytetracyclin (OTC)/kg, i.p. und Tag von Tag 10-14 auf Cytochromoxidaseaktivität, DNA-Gehalt/Embryo und spezifische Cytochromoxidaseaktivität.  
Einheiten und Bezeichnungen wie in Tab. 6

noch ausgeprägter: Geringe Dosen von 10 mg/kg und Tag führen hier bereits zu einer 34%igen Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität/Embryo, während dabei der DNA-Gehalt/Embryo noch nicht erniedrigt ist.

Dies demonstriert deutlich die selektive Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität, bei höheren Dosen wird, wie in der späten Organogenese, der DNA-Gehalt ebenfalls erniedrigt.

#### Einfluß von Oxytetracyclin

Da Oxytetracyclin bei regenerierender Leber ebenso wie Chloramphenicol spezifisch die Cytochromoxidase hemmt, interessierte, seine Wirkung auf diese Parameter beim Embryo zu untersuchen. Es wurde eine Dosis von 1000 mg Oxytetracyclin/kg und Tag von Tag 10-14 gegeben (Tab.11 ). Tatsächlich wird die Cytochromoxidaseaktivität um 50% gemindert, während der Zuwachs des DNA-Gehaltes nur geringfügig eingeschränkt ist. Oxytetracyclin erzeugt also, wenn auch in relativ hohen Konzentrationen, an embryonalem Gewebe qualitativ gleiche Veränderungen wie Chloramphenicol und Thiamphenicol.

#### 3.2.3 Einfluß von Thiamphenicol und Oxytetracyclin auf die Atmung von Embryonen

Um festzustellen, ob die Wachstumseinschränkung durch diese drei Antibiotica durch eine Cytochrom-Defizit-bedingte Minderung des Elektronenflusses

| Behandlung | n | $\dot{Q}_{O_2}$ | % Hemmung | p        |
|------------|---|-----------------|-----------|----------|
| Kontrollen | 7 | $12,2 \pm 0,4$  | -         | -        |
| TAP 10     | 4 | $8,9 \pm 1,2$   | 27        | = 0,0005 |
| TAP 30     | 5 | $7,9 \pm 0,4$   | 35        | < 0,0002 |
| TAP 100    | 4 | $6,1 \pm 0,3$   | 50        | < 0,0002 |
| TAP 300    | 6 | $5,4 \pm 2,4$   | 55        | < 0,0002 |
| OTC 100    | 4 | $9,4 \pm 1,6$   | 22        | = 0,005  |

Tab. 12 : Einfluß von 48-stündiger Thiamphenicol- und Oxytetracyclinbehandlung von Tag 10-12 auf die Atmung ganzer, "nackter" Embryonen.

TAP 10: 10 mg Thiamphenicol/kg und Tag

OTC 100: 100 mg Oxytetracyclin/kg und Tag

n = Anzahl der Messungen, jeweils 2 Embryonen/Gefäß

$$\dot{Q}_{O_2} = \mu l O_2 \cdot h^{-1} \text{ mg Trockengewicht}^{-1}$$

in der Atmungskette verursacht sein kann, wurde die Atmung von ganzen, 12 Tage alten Rattenembryonen ohne Fruchtblase nach der direkten Methode Warburgs gemessen. Die Ergebnisse in Tab. 12 demonstrieren, daß schon geringe Dosen Thiamphenicol (10 mg/kg) hoch signifikant die Atmung einschränken, bei höheren Dosen ist die Wirkung noch ausgeprägter, wobei hier berücksichtigt werden muß, daß die Atmung in der angegebenen Einheit " $\dot{Q}_{O_2}$ " bereits auf das Trockengewicht bezogen ist, daß sich ja bei höheren Dosen ebenfalls vermindert.

Auch Oxytetracyclin beeinträchtigt die Atmung nach zweitägiger Behandlung von Tag 10-12 (Tab. 12).

Durch 10 mg Thiamphenicol/kg und Tag von Tag 10 bis 12 wird die Cytochromoxidaseaktivität um 34%, die Atmung um 27% gehemmt, d.h. eine Einschränkung der Synthese von Atmungsketten-Cytochromen, gemessen am Beispiel der Cytochromoxidase, hat eine fast gleichstarke Reduzierung der Atmung zur Folge. Daraus kann geschlossen werden, daß zumindest zum Zeitpunkt der Messung, am Tag 12, falls überhaupt, die Cytochromoxidase nur in geringer Überschußaktivität vorliegen kann. Dies entspricht den Erwartungen, die aus dem Vergleich der spezifischen Cytochromoxidaseaktivität in verschiedenen Geweben und den Untersuchungen von SPIELMANN und LÜCKE folgen: Obwohl die spezifische Cytochromoxidaseaktivität in embryonalem Gewebe ca. zehnmal niedriger als in der Leber erwachsener Tiere ist (Abb. 14), wurde für beide Gewebe die gleiche Atmungsgröße gemessen.

Die Kurven für die beiden Parameter laufen bei höherer Dosierung von Chloramphenicol aber nicht parallel (Abb. 17).

Eine gleichstarke Einschränkung von Cytochromoxidaseaktivität und Atmung als "Gesamtreaktion" heißt aber noch nicht, daß erstere <sup>in</sup> embryonalem Gewebe der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der Atmungskette ist, da weitere, nicht gemessene Parameter eine Rolle spielen können.

### 3.2.4 Einfluß von Thiamphenicol und Oxytetracyclin auf den Häm- und Hämoglobin-gehalt des Rattenembryos

Da in den Mitochondrien auch Enzyme der Hämsynthese wie zum Beispiel die Ferrochelatase lokalisiert sind, interessierte der Einfluß von Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese auf die Hämsynthese beim Rattenembryo. Tab. 15 zeigt, daß normalerweise beim Rattenembryo der Hämgehalt in der späten Phase der Organogenese etwas steiler zunimmt als das Allgemeinwachstum, wahrscheinlich eine Folge der nach Anschluß der Placenta am Tag 12<sup>1/2</sup> erfolgten Zunahme der Hämoglobin- und Myoglobinsynthese.

Eine Dosis von 1000 mg Thiamphenicol/kg und Tag von Tag 12 bis 14 hemmt die de-novo-Synthese von Häm etwas stärker als die Synthese der DNA. Da

| Behandlung  | Kontrollen |           |           | TAP1000          | TAP 300          | TAP 100          | TAP 30           | TAP 10           | OTC 70           | OTC 30    |
|-------------|------------|-----------|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|
| Zeitraum    | 12         | 13        | 14        | 12-14            | 10-12            | 10-12            | 10-12            | 9-12             | 9-12             | 9-12      |
| n           | 9          | 6         | 9         | 13               | 2                | 7                | 4                | 4                | 2                | 6         |
| yHäm/E      | 37±5       | 103±23    | 383±43    | 200±48           | 9,9±1,2          | 12±6,2           | 24±8             | 26±6             | 15±0,3           | 35±4      |
| % Hemmung   |            |           |           | 48 <sup>xx</sup> | 72 <sup>xx</sup> | 67 <sup>xx</sup> | 33 <sup>x</sup>  | 28 <sup>o</sup>  | 58 <sup>xx</sup> | 0         |
| yDNA/Embryo | 125±9      | 298±35    | 718±18    | 474±76           | 72±7             | 81±12            | 99±15            | 96±9             | 115±3            | 128±13    |
| % Hemmung   |            |           |           | 34 <sup>xx</sup> | 43 <sup>xx</sup> | 35 <sup>xx</sup> | 21 <sup>xx</sup> | 23 <sup>xx</sup> | 23 <sup>xx</sup> | 0         |
| Häm/DNA     | 0,29±0,04  | 0,38±0,05 | 0,54±0,04 | 0,43±0,07        | 0,14±0,02        | 0,14±0,06        | 0,24±0,05        | 0,26±0,02        | 0,28±0,05        | 0,27±0,07 |
| % Hemmung   |            |           |           | 19 <sup>xx</sup> | 53 <sup>xx</sup> | 53 <sup>xx</sup> | 17 <sup>o</sup>  | 8 <sup>o</sup>   | 42 <sup>xx</sup> | 0         |

Tab. 13 Einfluß von Thiamphenicol (TAP) und Oxytetracyclin (OTC) auf den Häm-Gehalt/Embryo, den DNA-Gehalt/Embryo und den Hämgehalt/DNA in der Phase der Organogenese des Rattenembryos. In der Spalte "Zeitraum" Websterstage der Kontrollen bzw. Schwangerschaftstage mit Behandlung n= Anzahl der Präparationen. Pro Präparation wurden jeweils 16 (Tag 12) bzw. 8 (Tag 14) Embryonen verwendet. Die Indices geben die Substanz in mg/kg und Tag an. xx:  $p < 0,0027$ , x:  $0,0027 < p < 0,005$ , o:  $p > 0,01$  (keine Signifikanz)

aus den Ergebnissen aus Abb.16 als wahrscheinlich angenommen werden kann, daß bei einer solchen Dosierung die mitochondriale Proteinsynthese permanent gehemmt ist, kann die weitere Zunahme des Hämgehaltes von Tag 12 bis 14 unter Thiamphenicol dadurch erklärt werden, daß zum Beispiel die Aktivität der bereits bis zum Tag 12 synthetisierten Ferrochelataase ausreicht, um noch eine bestimmte Menge Häm zu bilden.

Im Einklang mit der wesentlich höheren Proliferationsrate zwischen Tag 10 und 12 ist die Wirkung auch auf die Häm-Synthese in dieser Phase der Organogenese ausgeprägter. Eine 48-stündige Behandlung mit einer Dosis von 30 mg Thiamphenicol/kg und Tag hemmt die Häm-Synthese etwas stärker als die DNA-Synthese. Mit einem Behandlungsbeginn am Tag 9 kann kein stärkerer Effekt als mit einem solchen als an Tag 10 erzielt werden, obwohl der Embryo am Tag 9 eine höhere Wachstumsrate aufweist (KÖHLER 1971). Dies könnte bedeuten, daß der für die Häm-Synthese entscheidende Anstieg Ferrochelataase-Synthese und eventuell auch der mitochondrialen Proteinsynthese erst nach Tag 9, wahrscheinlich am Tag 10, erfolgt.

Oxytetracyclin, das bei regenerierender Leber zu gleichen Effekten auf die spezifische Cytochromoxidaseaktivität wie Chloramphenicol führt, erniedrigt ebenfalls den spezifischen Hämgehalt beim Embryo. Interessant ist, daß die Häm-Synthese im Embryo und Eihäuten weniger beeinflußt ist als die Synthese der Cytox im Embryo.

Als Ursache liegt eine Hemmung der de-novo-Synthese der Ferrochelataase nahe. MANYAN et al. konnten im Knochenmark von Hunden eine ausgeprägte Hemmung der Ferrochelataase-Synthese durch Chloramphenicol nachweisen, gleichzeitig aber auch eine starke Erhöhung des freien Erythrozyten-Porphyrins, was nahe legt, daß nur der letzte Schritt der Hämbiosynthese, die Inkorporation von Eisen in Protoporphyrin zu Protohäm durch die Ferrchelataase, gegenüber einer Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese empfindlich ist.

Häm stimuliert in geringen Konzentrationen die mikrosomale Proteinsynthese in Retikulozyten (MAXWELL, KAMPER, RABINOWITZ). So kann ein durch Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese erzeugtes Hämdefizit zu einer indirekten Hemmung der mikrosomalen Proteinsynthese zumindest in den Zellen der Erythropoese, insbesondere den Retikulozyten führen. Dies mag mit dem früheren Absinken der Retikulozyten unter Chloramphenicol (RUBIN et al.) und Thiamphenicol (Abb.25) erklären.

Eine Hauptaufgabe des kardiovaskulären Systems ist die ausreichende Sauerstoffversorgung des Organismus dann, wenn bloße Diffusion dies nicht mehr gewährleistet.

Hämoglobin als sauerstofftransportierendes Protein und Myoglobin als Sauerstoffspeicher z.B. des Myocards wie auch die für die - gegen- über der Glykolyse - hocheffiziente respiratorische ATP-Produktion erforderlichen Atmungsketten-Cytochrome sind durch ihren Bedarf an Häm als funktionelle Gruppe sämtlich von der Aktivität der Ferrochelatase - und damit möglicherweise der mitochondrialen Proteinsynthese - abhängig. Deshalb sollen die Messungen der Aktivitäten dieses Enzyms und seiner Hemmbarkeit durch Chloramphenicol, Thiamphenicol und Oxytetracyclin die Frage klären helfen, ob die Mitochondrien in der Phase der Organogenese eine Schrittmacherrolle spielen.

### 3.2.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die spezifische Hemmung der Hämoglobinsynthese an den Zellen der fetalen Erythropoese in der Embryoleber läßt sich dadurch demonstrieren, daß der hohe Hämoglobingehalt des Cytoplasmas dieser Zellen normalerweise zu einer entsprechend hohen Elektronendichte gegenüber den übrigen Zellen führt. Die Abb. 18 bzw. 19 lassen eine deutliche Hypochromasie der Proerythroblasten erkennen. Diese Befunde präsentieren das morphologische Korrelat zu den biochemischen Werten aus Tab. 13

Die Chloramphenicol-Wirkung ist offenbar - wie zu erwarten - von der Proliferationsrate der betroffenen Zellen abhängig. Diese ist auch im embryonalen Gewebe nicht bei allen Zelltypen gleich. Weiteren Aufschluß in dieser Beziehung können elektronenoptische Untersuchungen geben.

Die zum Zeitpunkt der Behandlung nicht mehr proliferierende Nervenzelle in der Mitte der Abb. 20 zeigt normale Mitochondrien mit dichter Matrix und zahlreichen Cristae. Unter dem Einfluß von Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese kommt es jedoch in Glioblasten zu einer ausgeprägten Schwellung, die den Durchmesser der Mitochondrien bis auf das Dreifache zu nehmen läßt. (Abb. 21 bis 23)



Abb. 18 Erythroblast in embryonaler Leber (Schwangerschaftstag 12). N= Nucleus, O= freie Ribosomen. M= Mitochondrien. Die hohe Elektronendichte des Cytoplasmas beruht auf seinem Gehalt an Hämoglobin. Vergrößerung 1:48 000

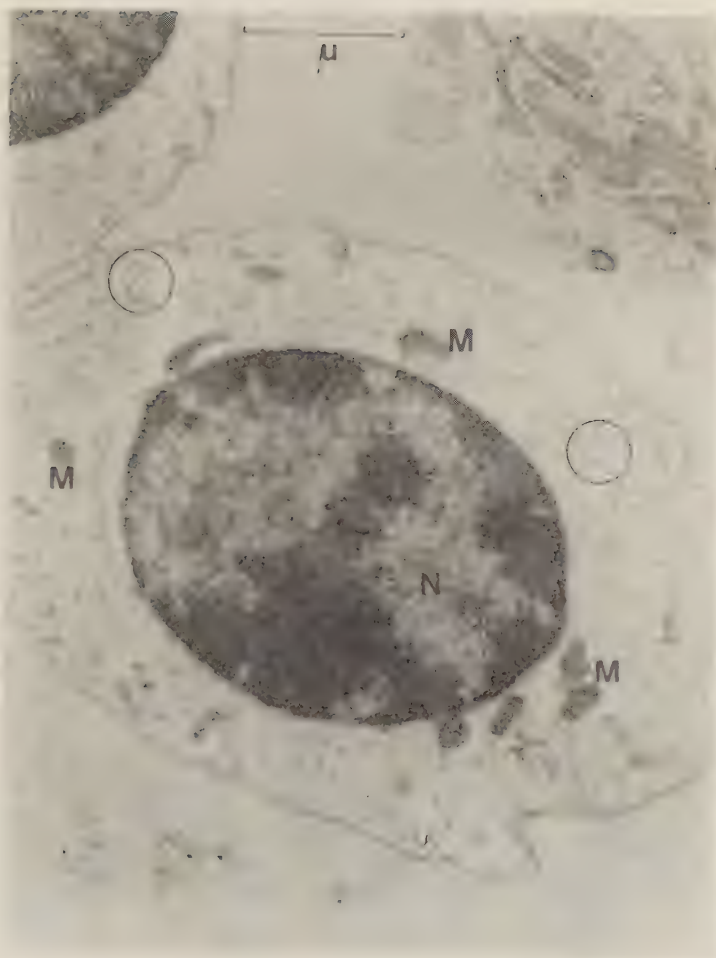


Abb. 19 Erythroblast in embryonaler Leber (Tag 12) nach 48-  
 stündiger Dauerinfusion von 1000 mg Chloramphenicol/kg  
 und Tag. N= Nucleus, M= unauffällige Mitochondrien ohne  
 Anhalt für intramitochondriale Eisenablagerung. Stark  
 verringerte Elektronendichte des Cytoplasmas. Kein vermehr-  
 tes Auftreten von Siderosomen.  
 Vergrößerung 1:40 000

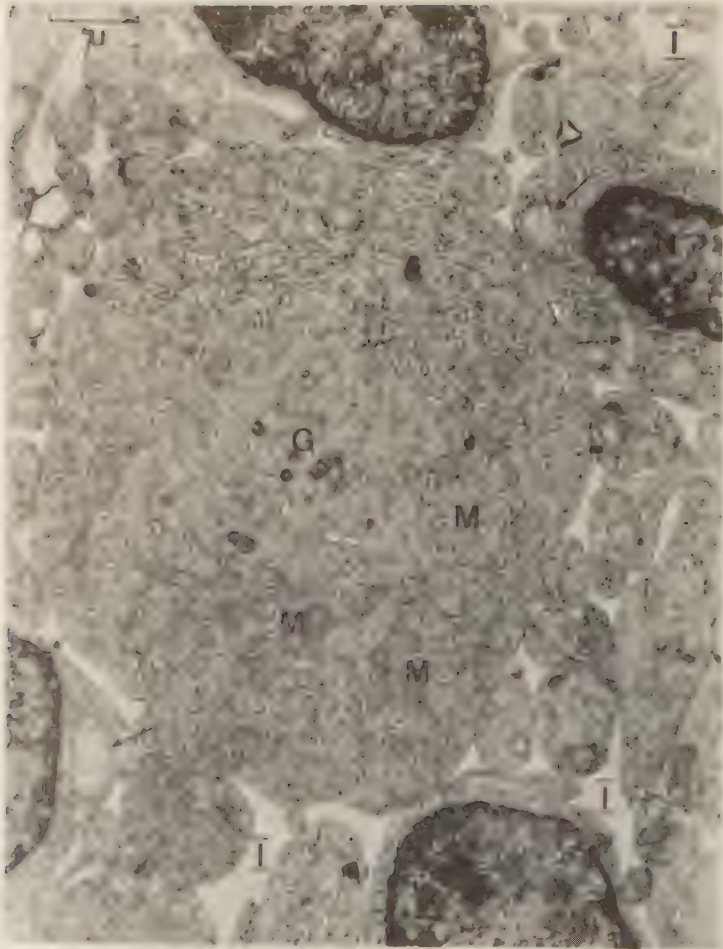


Abb. 20 Rattenembryo Tag 12, Parietalcortex. 48-stündige Dauerinfusion von 1000 mg CAP/kg und Tag. Sich differenzierender Neuroblast mit intakten Mitochondrien (M). In den Glioblasten der Umgebung geschwollene Mitochondrien (↓). I = Interstitieller Raum, N = Nucleus, G = Golgi-Apparat  
Vergrößerung 1:21 000

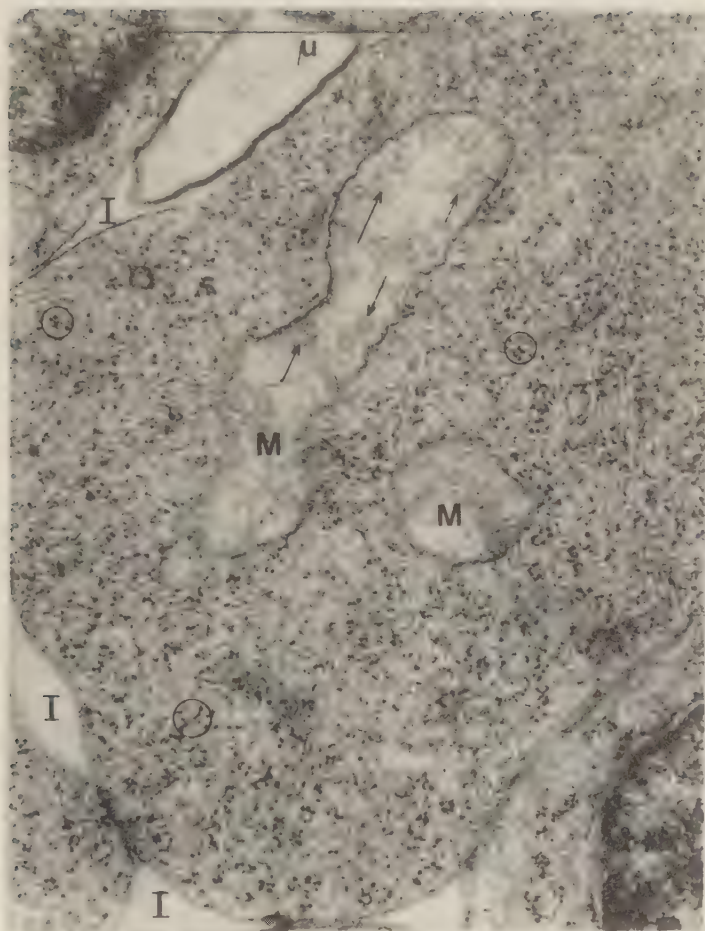


Abb.21 Parietalcortex eines Rattenembryos von Tag 14. 4 Tage  
100 mg Oxytetracyclin/kg und Tag. Geschwollene Mitochon-  
drien (M) mit vesiculärem Zerfall (↓) der Cristae.

I= interzellulärer Raum

O= Ribosomen

N= Nucleus

Vergrößerung 1:70 000

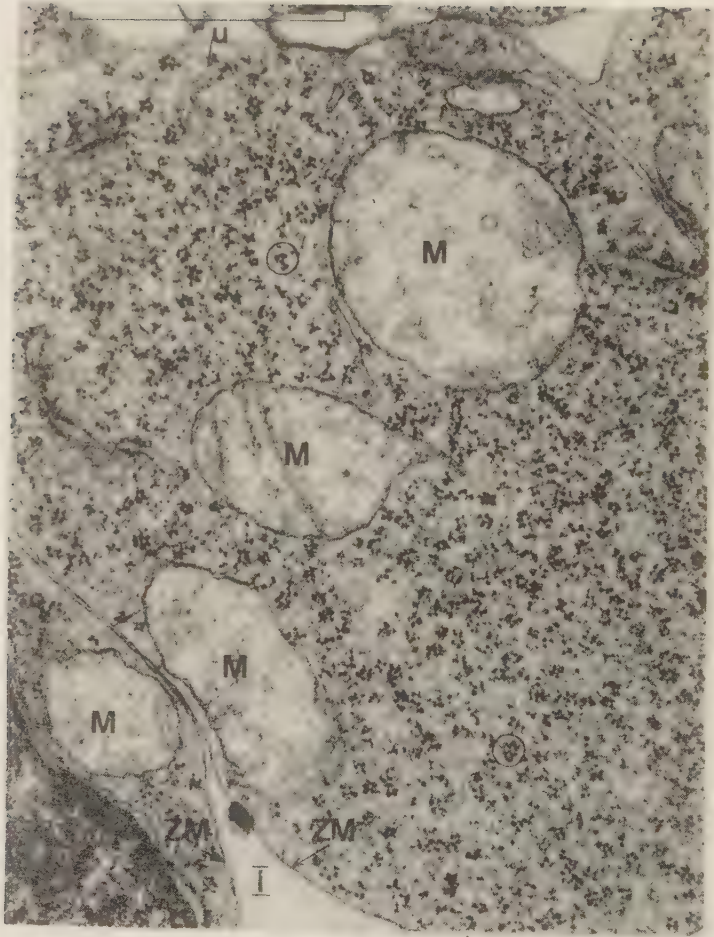


Abb. 22 Rattenembryo Tag 14 nach 4-tägiger Behandlung mit 100 mg Oxytetracyclin/kg und Tag. Parietalcortex. Stark geschwollene und veränderte (Cristaeschwund, vesiculäre Umwandlung) Mitochondrien (M) aus einem Glioblasten.  
X= rauhes endoplasmatisches Retikulum,  
I= interstitieller Raum,  
O= Ribosomen,  
ZM= Zellmembran  
Vergrößerung 1:70 000



Abb. 23 Rattenembryo Tag 14. 4 Tage 100 mg Oxytetracyclin/kg und Tag. Mesenchym im Kopfbereich mit einem Gefäß, das geschwollene Mitochondrien enthält (M).

L= vesiculär zerfallene Cristae.

E= Endothelzellen

MI= mesenchymales Interstitium.

Vergrößerung 1:49 000

### 3.2.6 Teratologische Untersuchungen nach Thiamphenicol-Gabe in der späten Phase der Organogenese

Wir haben teratologische Versuche mit Thiamphenicol begonnen. Resultate der ersten, orientierenden Experimente sind in Tab.14 zusammengestellt. Erst eine Dosis von 300 mg Thiamphenicol/kg und Tag von Tag 12 bis 14, die die Cytochromoxidaseaktivität um 80% und das Feuchtgewicht des Embryos an Tag 14 um 24% gemindert hatte, führt zur deutlichen Reduktion des Feuchtgewichtes auch des 20 Tage alten Feten um 27% (Tab.14 ). Die 3,3fach höhere Dosis von 1000 mg resultiert in der Resorption sämtlicher Embryonen, wahrscheinlich zwischen Tag 15 und 16, während 100 mg, trotz Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität um 55% und des Feuchtgewichtes um 24%, makroskopisch keine Zeichen einer Beeinflussung erkennen lassen. Licht- und elektronenmikroskopische wie auch hämatologische Untersuchungen und ein Vergleich der Überlebensdauer von Nachkommen behandelter und unbehandelter Muttertiere sollen sich anschließen, um zu prüfen, ob es zum Beispiel zu einer Hypo- oder Aplasie des lymphatischen Gewebes kommt, da insbesondere die Lymphozyten Thiamphenicol-sensibel reagieren, wie die Ergebnisse des folgenden Kapitels demonstrieren.

Es muß betont werden, daß die bereits groben embryotoxischen Effekte zwar erst mit höheren Dosen, aber schon allein nach 48-stündiger Behandlung erzielt wurden, so daß nicht auszuschließen ist, daß auch die protrahierte Einnahme therapeutischer Dosen Thiamphenicol oder von anderen, sich pharmakokinetisch ähnlich verhaltenden Chloramphenicol-Derivaten in der Phase der Organogenese zu schädlichen Wirkungen auf den menschlichen Embryo führen kann.

### Literaturangaben über die Embryotoxizität von Chloramphenicol und Thiamphenicol

Chloramphenicol gehörte in den Fünfziger und zu Beginn der Sechziger Jahre zu den meist verordneten Antibiotika. Für Thiamphenicol sind vom Hersteller inzwischen rund 12 Millionen Behandlungsfälle berechnet worden (ZAMBON). Berichte über eine teratogene Wirkung beider Antibiotika beim Menschen liegen nicht vor.

|           | Mutter-<br>tiere | Feten<br>insgesamt | Feten<br>Muttertier | Resorp.<br>insgesamt | Feuchtgw.<br>d.Feten(m)        | Asymm.<br>Wirbelk. | Gespalt.<br>Wirbelk. | Retardierte<br>Feten <sup>x</sup> |
|-----------|------------------|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Kontrolle | 7                | 47                 | 6,7                 | 0                    | 3,4+0,3                        | 0                  | 0                    | 1                                 |
| TAP 1000  | 9                | 0                  | 0                   | 87                   | -                              | -                  | -                    | -                                 |
| TAP 300   | 8                | 65                 | 8,1                 | 3                    | 2,5+0,3<br>= - 27%<br>p<0,0002 | 1                  | 2                    | 17                                |
| TAP 100   | 9                | 70                 | 7,7                 | 0                    | 3,3+0,3                        | 1                  | 0                    | 3                                 |

Tab. 14 Einfluß einer 48-stündigen Behandlung mit 100, 300 und 1000 mg Thiamphenicol (TAP 100, 300, 1000) von Tag 12 bis 14 auf verschiedenen Parameter des 20 Tage alten Rattenembryos.

weitere makroskopisch sichtbare Skeletteformitäten konnten nicht gefunden werden.

<sup>x</sup> = gemessen an der Skeletteife

Tierexperimentell fand jedoch TAKAYA bei Ratten nach 700 - 1200 mg Chloramphenicol/kg und Tag vom 6. bis 10. Tag eine erhöhte Zahl von Entwicklungsstörungen des Auges und Hydronephrose. Nach FRITZ und HESS führen hohe Dosen Chloramphenicol (1000 bzw. 2000 mg/kg und Tag) bei Ratten, Mäusen und Kaninchen zu Fruchttod, verminderter Ossifikation und Gewichtsabnahme wie auch zu Umbilikalhernien. COURTNEY und VALERIO gaben drei Affen 100 - 200 mg Chloramphenicol/Tier und Tag für 6 bis 17 Tage in verschiedenen Intervallen zwischen dem 65. und 95. Schwangerschaftstag. Neben zwei normalen Jungen kam es zu einer Totgeburt, die anatomisch unauffällig war. SILVA und ANDRADE verabreichten schwangeren Ratten vom 1. bis 6. Schwangerschaftstag jeden zweiten Tag 100 mg Thiamphenicol/kg und Tag. Am Tag 20 finden sie eine mit 60% gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit 5,4% stark erhöhte Zahl von Resorptionen. Unter den überlebenden Feten behandelter Muttertiere ist die Zahl der Mißbildungen mit 11% gegenüber 1% der Kontrollen ebenfalls erhöht. Sie bestehen in einer Verkürzung der oberen und unteren Extremitäten einer Körperhälfte.

MACKLER verfütterte schwangeren Ratten von Tag 0 der Schwangerschaft an eine 3% Chloramphenicol enthaltende Diät, und fand im Homogenat 14 Tage alter Embryonen eine Reduzierung der Antimycin-empfindlichen DPNH-Oxidase-Aktivität gegenüber den Kontrollen um 70%, wohingegen die Succinat-Oxidase- und mitochondriale ATPase-Aktivität nur um 30% reduziert waren. Ultrastrukturell wiesen die Mitochondrien der Embryonen eine deutliche Verringerung der Cristae auf. In den behandelten Gruppen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Resorptionen, die überlebenden Feten waren in Größe und Gewicht reduziert. Er schließt, daß der oxidative Stoffwechsel für das embryonale Wachstum und die Entwicklung bis Tag 11 keine wesentliche Rolle spielt, danach aber die Elektronen-transportierenden Systeme und die damit verbundene Phosphorylierung steil zunehmen, an Bedeutung für den Embryo gewinnen und ihre Hemmung zu ausgeprägten Veränderungen in Wachstum und Entwicklung führen.

Diese Schlußfolgerungen werden durch die hier vorgelegten Untersuchungen stark gestützt.

Die Tatsache, daß bisher keine Mißbildungen nach Chloramphenicol beim Menschen mitgeteilt wurden, schließt nicht aus, daß die Einnahme sogar therapeutischer Dosen während der Schwangerschaft zu Aborten führen kann, die eventuell bislang denjenigen Infektionskrankheiten ätiologisch zugeordnet wurden, die Anlaß zur Medikation waren. Es muß nämlich berücksichtigt werden, daß in der klinischen Untersuchung von RUBIN et. al. die dreiwöchige Einnahme von therapeutischen Dosen von 2 g Chlorampheni-

col/Tag bei 10% der Patienten zu cytostatischen Wirkungen im peripheren Blutbild führte, demzufolge wären für das wesentlich schneller wachsende embryonale Gewebe jene deletären Folgen nicht auszuschließen, wie sie die allein zweitägige Thiamphenicol-Behandlung beim Rattenembryo zeigte.

#### Literaturangaben über die Embryotoxizität des Oxytetracyclin

Nach Einnahmen von Tetracyclinen während der Schwangerschaft sind beim Menschen Farbstörungen der Zähne und Wachstumshemmung der langen Knochen beschrieben worden (TOAFF und RAVID, COHLAN). Die Störung des Knochenwachstums wird auf eine Hemmung der Kalzifikation durch Tetracycline zurückgeführt, die mit Kalziumionen einen Chelatkomplex bilden sollen (SAXEN).

Tierexperimentell führen nach FILIPPI und DETJUK, VDOWITSCHENKO und KARTYSCH Tetracycline bei der Ratte zu Gewichtsreduzierung der Feten und erhöhter Resorptionsquote.

Auf Grund der hier vorgelegten Untersuchungen kann für Chloramphenicol, Thiamphenicol und Oxytetracyclin ein zusätzlicher, neuartiger embryotoxischer Mechanismus angenommen werden:

Diese Antibiotika reduzieren de-novo-Synthese der Cytochromoxidase, embryonale Atmung und Hämsynthese. Durch die Einschränkung der respiratorischen ATP-Produktion kommt es zur Proliferationshemmung. Klinische Bedeutung dürfte dies aus pharmakokinetischen Gründen hauptsächlich für Chloramphenicol und Thiamphenicol haben. Insbesondere bei der häufigen Indikation "Pyelonephritis gravidarum" sollte die potentielle Embryotoxizität des Thiamphenicols Berücksichtigung finden.

### 3.2.7 Knochenmark

Nachdem an embryonalem Gewebe gezeigt werden konnte, daß Chloramphenicol und Thiamphenicol die Cytochromoxidasynthese und möglicherweise als Folge über die Einschränkung der Atmung die Proliferation beeinträchtigen, findet der Einfluß dieser Antibiotika auf die Cytochrom-oxidaseaktivität im Knochenmark aus folgendem Grund besonderes Interesse:

Hier würde eine Hemmung dieses lebenswichtigen Atmungskettenenzym die bei Überdosierung von Chloramphenicol als obligat bekannten cytostatischen Effekte im peripheren Blutbild als eine aus dem chemotherapeutischen Prinzip folgende Zwangsläufigkeit erklären.

Die Schwierigkeit, die cytostatischen Wirkungen des Chloramphenicol bei Laboratoriumstieren, vor allem bei der Ratte, zu reproduzieren, sind bekannt (BRITISH MEDICAL JOURNAL, Editorial). Wie die Versuche an Embryonen gezeigt haben, kann selbst mit hohen Dosen und intravenöser Dauerinfusion eine permanente Chloramphenicol-Serumkonzentration bei der Ratte nur für ca. 24 bis 30 Stunden erzielt werden. Deshalb wurde für die Langzeitversuche, wie hier im Knochenmark, ausschließlich Thiamphenicol verwendet.

Ca. 850 bis 950 g schwere Meerschweinchen erhielten 24 Tage lang 100 mg Thiamphenicol/kg und Tag, in zwei täglichen Einzeldosen subkutan injiziert. Für das Bezugssystem konnte in diesem Falle auf die sonst übliche Präparation kernhaltiger Zellen verzichtet werden, da die Erythrozyten weder DNA noch Mitochondrien enthalten und so durch etwaige unterschiedliche Blutbeimengungen des Knochenmarkhomogenates keiner der beiden gemessenen Parameter beeinflusst werden kann. Nach 6 Tagen ist die spezifische Cytochromoxidaseaktivität bereits um 30%, nach 12 Tagen um 50% abgesunken (Abb. 24). Nach 24 Tagen ist sie jedoch gegenüber dem 12-Tage-Wert leicht angestiegen. Dies könnte folgenden Grund haben: Zahl der Mitochondrien und Atmungsenzymaktivitäten/Zelle können mit zunehmender Reifung im hämatopoietischen Gewebe abnehmen.

Bei einer Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese ist bei denjenigen Zell-Reifungsstadien am ehesten ein Proliferationsstopp zu erwarten, die die niedrigste spezifische Aktivität aufweisen, also den reiferen Formen, so daß nach einer bestimmten Behandlungsdauer die relativ unreifen Zellen mit höherer spezifischer Cytochromoxidaseaktivität einen prozentual größeren Anteil einnehmen. Einen Anhalt dafür bietet auch die unter Thiamphenicol

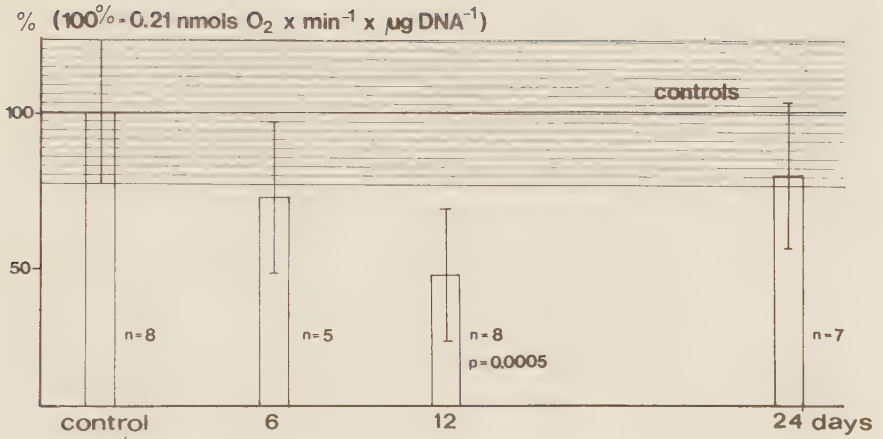


Abb. 24: Cytochromoxidaseaktivität im Homogenat von Knochenmark von Meerschweinchen unter täglicher Behandlung mit 100 mg Thiamphenicol/Kg/Tag. n= Anzahl der Versuchstiere.

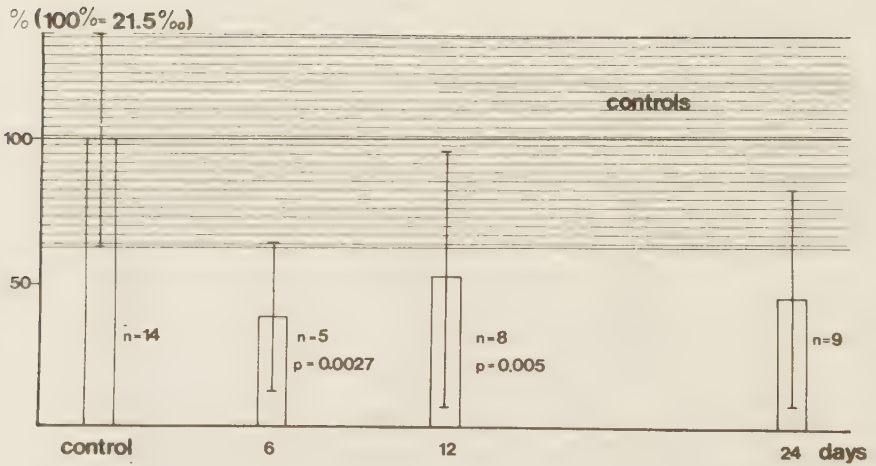


Abb.25: Retikulocytenzahl im peripheren Blut von Meerschweinchen unter täglicher Behandlung mit 100 mg Thiamphenicol/kg/Tag.  
n= Anzahl der Versuchstiere.

|                             |            |            |               |            |               |
|-----------------------------|------------|------------|---------------|------------|---------------|
| Lymphocyten/mm <sup>3</sup> | 3140 ± 980 | 1599 ± 877 | %Hemmg.<br>50 | 1239 ± 612 | %Hemmg.<br>60 |
| Behandlungsdauer            | Kontrollen | 12 Tage    |               | 24 Tage    |               |
| n                           | 9          | 8          |               | 9          |               |
| p                           | 1/.        | < 0.005    |               | < 0.0002   |               |

Tab.15 : Einfluß von 100 mg Thiamphenicol/kg und Tag auf die Lymphocytenzahl im peripheren Blut nach 12 und 24 Tagen Behandlungsdauer.

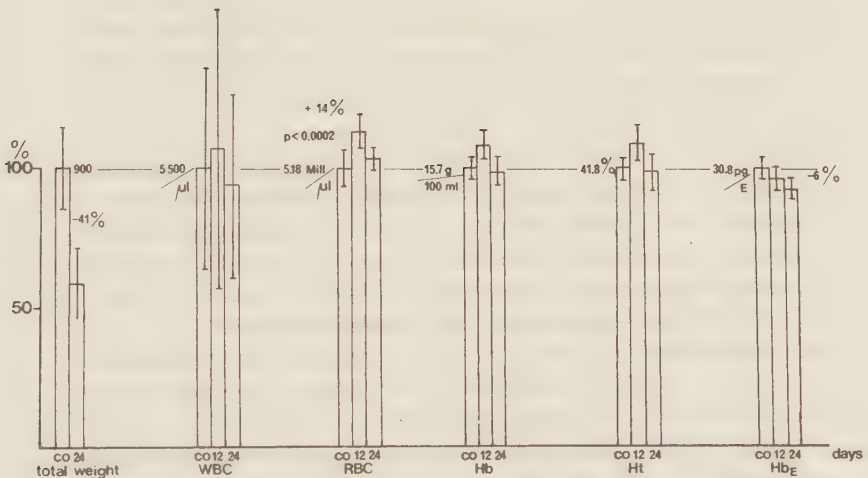


Abb.26 : Einfluß von 100 mg Thiamphenicol/kg und Tag auf das Körpergewicht und hämatologische Parameter beim Meer-schweinchen.

WBC = Leukozyten/ mm<sup>3</sup>  
 RBC = Erythrocyten /mm<sup>3</sup>  
 Hb = Hämoglobin (g/100ml)  
 Ht = Hämatokrit (%)  
 Hb<sub>E</sub> = Hämoglobin/Erythrocyt  
 nicht Toxik

Die hämatologischen Untersuchungen wurden zusammen mit Herrn Dr. H.-J. Kirstaedter durchgeführt, dem ich dafür freundlich danke.

beim Menschen beobachtete Linksverschiebung im Knochenmark (KALT-WASSER). Retikulozyten- und Lymphozytenwerte im peripheren Blutbild fallen deutlich ab (Abb. 25, Tab. 15). Die besondere Empfindlichkeit der Lymphozyten kann ihre Ursache neben einer geringen Überschußaktivität in der kurzen Lebensdauer und damit einer relativ hohen Proliferationsrate eines großen Teils dieser Population haben (METCALF, EVERITT und TYLER). Leukozytenzahlen, Erythrozyten, Hämoglobingehalt und Hämatokrit bleiben über den gesamten Versuchszeltraum fast im Normbereich, das Gesamtgewicht der Tiere nimmt aber im Durchschnitt um 40% ab (Abb. 26). Da als Ursache des Gewichtsverlustes eine Dehydratation nicht ausgeschlossen werden kann, mag eine Hämokonzentration trotz Proliferationshemmung normale Blutzellwerte vorgetäuscht haben. Für eine Hämokonzentration spricht auch der Anstieg der Leukozyten und Erythrozyten nach 12 Tagen, einem Zeltraum, wo der antiproliferative Effekt erst sehr gering sein kann. Unter dieser Annahme wären Retikulozyten- und Lymphozytenwerte in Wirklichkeit noch stärker abgesunken.

Bei sämtlichen behandelten Tieren fielen deutliche Akrozyanose, Dyspnoe und massiver Haarverlust auf. Zwischen dem 10. und 24. Tag starben 60% der behandelten Tiere. Die Ursache der hohen Empfindlichkeit dieser Spezies gegenüber Thiamphenicol ist unklar.

Der Vergleich der spezifischen Cytochromoxidaseaktivität proliferierender und nicht proliferierender Gewebe in Abb. 14 läßt erkennen, daß das Knochenmark der Meerschweinchen die niedrigsten Werte und deshalb, falls überhaupt, die geringste Überschußaktivität erwarten läßt. Dies mag die Frage beantworten, weshalb das Knochenmark das Zielorgan der unerwünschten Wirkungen von Chloramphenicol und Thiamphenicol ist.

Es muß berücksichtigt werden, daß der Einfluß einer Verringerung der de-novo-Synthese von Cytochromoxidase auf das Wachstum nicht nur von Proliferationsrate und Überschußaktivität, sondern theoretisch auch von der glykolytischen ATP-Produktionskapazität als Kompensationsmöglichkeit abhängig zu denken ist. Diese Werte können für jedes der untersuchten Gewebe schwanken.

Die Hemmung der de-novo-Synthese der Cytochromoxidase im Knochenmark zeigt, daß auch hier die cytostatischen Symptome als eine Folge des chemotherapeutischen Prinzips des Thiamphenicols interpretiert werden können.

### 3.2.8 Einfluß auf das Hodenepithel

Als weiteres schnell proliferierendes Gewebe interessiert die Beeinflussung der Cytochromoxidaseaktivität im Hodenepithel. Abb.27 zeigt den Regenerationsmodus des Samenepithels der Ratte (HILSCHER). Daraus geht hervor, daß aus den Stamm-Spermatogonien ( $A_1$ ), die die Matrix des Samenepithels bilden (HILSCHER), über sechs Zellteilungen die Spermatozyten hervorgehen; dieser Vorgang benötigt ca. 8 Tage; nach 20 Tagen entwickeln sich die Spermatozyten über zwei Reifeteilungen zu den Spermatiden mit 22 Tagen Lebensdauer. Neben zwei pools von relativ langlebigen, ruhenden Zellkategorien (Spermatozyten und Spermatiden) weist der Hoden solche Zellarten auf, die in wenigen Tagen mehrere Mitosen bzw. Meiosen durchlaufen. Die Lebenszeit der einzelnen Spermatogonien-Generationen beträgt insgesamt etwa 8 Tage; bei einer vollständigen Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese müßte in dieser Zeit nach fünf Mitosen die Cytochromoxidaseaktivität der - neu gebildeten - Spermatozyten auf etwa 3% gegenüber unbehandelten Kontrollen abgesunken sein - vorausgesetzt, daß

1. normalerweise die Cytochromoxidaseaktivität/Hodenzone für jede Zellkategorie konstant bleibt, - so daß bei jeder Teilung zur Hälfte neue Mitochondrien gebildet würden - und
2. eine so starke Reduzierung der Cytochromoxidaseaktivität nicht schon zu einem Reifungsstop vor den Spermatozyten führt.

Unter permanenten und ausreichend hohen Thiamphenicol- und Oxytetracyclin-Konzentrationen müßte es somit auch in den beiden "ruhenden pools" der Spermatozyten und Spermatiden zu einer Reduzierung des Cytochromoxidasegehalts kommen.

Um die erforderlichen Konzentrationen zu erzielen, erhielten männliche Ratten folgende hohen Dosen (jeweils auf kg Körpergewicht und Tag bezogen)

- |                    |              |          |
|--------------------|--------------|----------|
| 1. Thiamphenicol:  | 1. - 5. Tag: | 2000 mg; |
|                    | 5. - 9. Tag: | 1000 mg. |
| 2. Oxytetracyclin: | 1. Tag:      | 400 mg;  |
|                    | 2. + 3. Tag: | 200 mg;  |
|                    | 4. - 9. Tag: | 100 mg.  |

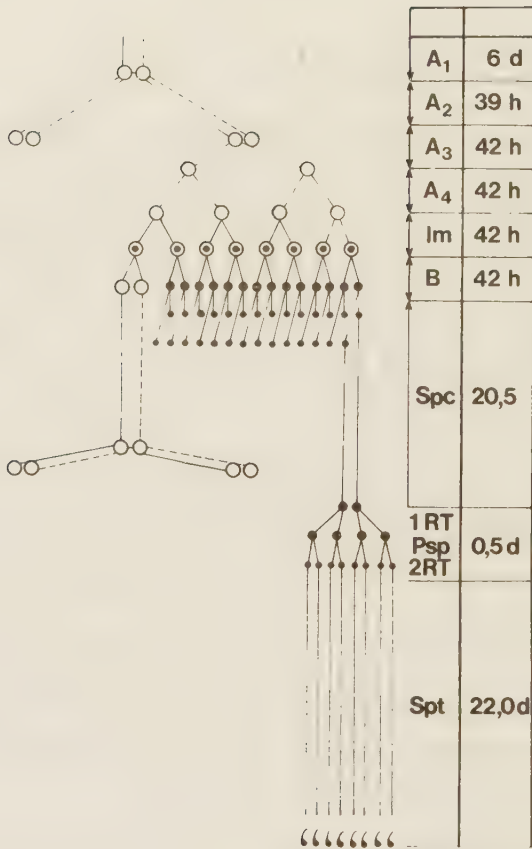


Abb. 27 Regenerationsmodus des Samenepithels nach HILSCHER:

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>: Staub-Spermatogonien; Im: Intermediär-Spermatogonien; B: Krusten-Spermatogonien; Spc: Spermatocyten; 1. RT: 1. Reifeteilung; Psp: Präspmatiden; Spt: Spermatiden. Lebensdauer der einzelnen Keimzellenkategorien. d: Tage; h: Stunden.

|                | n | Hoden-<br>feuchtgew. | Gesamt-DNA<br>Hoden | Cytox/DNA <sup>1)</sup> | %<br>Hem-<br>mung |
|----------------|---|----------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| Kontrollen     | 5 | 2,94 ± 0,27          | 2,38 ± 0,30         | 2,73 ± 0,24             | -                 |
| Thiamphenicol  | 5 | 2,55 ± 0,36          | 2,21 ± 0,41         | 1,29 ± 0,29             | 53%               |
| p              |   |                      |                     | <0,0002                 |                   |
| Oxytetracyclin | 5 | 2,69 ± 0,23          | 2,21 ± 0,14         | 1,78 ± 0,14             | 35%               |
| p              |   |                      |                     | <0,0002                 |                   |

Tab. 16 Einfluß einer 9-tägigen Behandlung mit Thiamphenicol und Oxytetracyclin (Dosenangaben siehe Text, Seite 65) auf die spezifischen Cytochromoxidaseaktivität, Hodenfeuchtgewicht (in g) und DNA-Gehalt des Hodens (in mg).

1) in nMol O<sub>2</sub> · min<sup>-1</sup> · DNA<sup>-1</sup>

In der Thiamphenicol-Gruppe (Tab. 16) wird das Hodenfeuchtgewicht um 15%, der DNA-Gehalt des Organs kaum, die Cytochromoxidaseaktivität/DNA aber um 53% reduziert. Unter Oxytetracyclin kommt es zu ähnlichen Wirkungen: Verminderung des Organfeuchtgewichtes um 8% und der spezifischen Cytochromoxidaseaktivität um 35%. Es ist allerdings unklar, weshalb trotz der hohen Dosis diese Effekte - wie bei regenerierender Leber - mit Oxytetracyclin etwas geringer sind.

Bei der Sektion sämtlicher Tiere der Thiamphenicol-Gruppe fiel der goldgelbe, dünnflüssige, klare Darminhalt auf. Daß unter Antibiotikatherapie der Stuhl unter Umständen nur Bilirubin enthalten kann, ist aus der Klinik bekannt; die Verminderung der bakteriellen Reduktion von Bilirubin zu Urobilin wird dafür verantwortlich gemacht (SCHAUB). Interessanterweise zeigt der Darminhalt der Oxytetracyclin-Tiere gegenüber den Kontrollen aber keine Veränderung, so daß trotz der hohen - subkutanen - Dosierung die Oxytetracyclin-Konzentrationen vermutlich nicht ausreichen, sämtliche Permeabilitätsschranken zu überwinden, oder Oxytetracyclin wird bei der Ratte kaum über die Galle eliminiert.

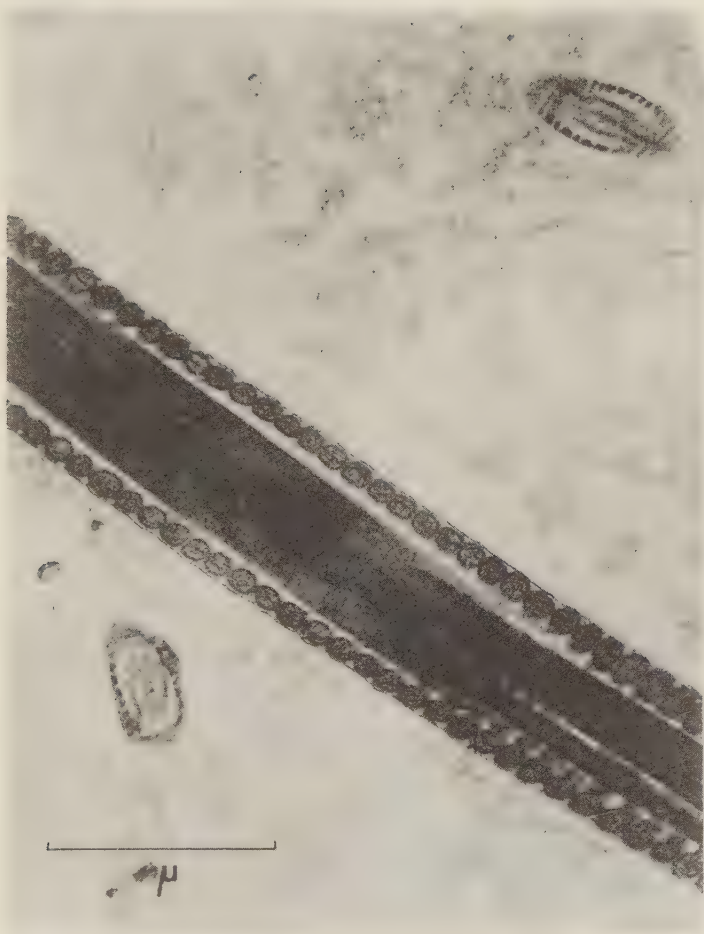
Über Störungen des Keimepithels durch Chloramphenicol bzw. Oxytetracyclin ist bislang nicht berichtet worden. Um die hier beschriebene Hemmung der Cytochromoxidasynthese und die Veränderungen der Mitochondrien-Ultrastruktur nach möglichst kurzer Behandlungszeit zu erzielen, waren sehr hohe Dosen von Thiamphenicol und Oxytetracyclin gewählt worden. Da Thiamphenicol in 80% (KALTWASSER), Chloramphenicol ca. 10% der Behandlungsfälle (RUBIN et al.) bereits in therapeutischen Dosen zu einer Proliferationshemmung der Hämatopoiese führen, die aufgrund der vorliegenden Untersuchungen durch eine Hemmung der Cytochromoxidasynthese bedingt sein dürften, ist auch eine Beeinträchtigung der Funktion des Hodenepithels dann wahrscheinlich, wenn diese beiden Antibiotika über längeren Zeitraum gegeben werden. Neben einer Reduzierung der Spermienzahl als Zeichen der antiproliferativen Wirkung ist vor allem eine Mobilitätsstörung der Spermien aus folgendem Grunde wahrscheinlich:

Die Mitochondrien sind im Mittelstück der Spermien girlandenartig aufgerollt und sie sollen die ATP-Mengen produzieren, die für die aktive Fortbewegung der Spermien erforderlich sind. Weitere, besonders Langzeitversuche, sind notwendig.

Elektronenoptische Untersuchungen ( Abb.28 bis 30 ) zeigen wie bei anderen Geweben auch im männlichen Keimepithel Cristolyse und Matrixaufhellung der Mitochondrien.

Abb. 28     Normaler Spermienhals (Ratte) mit Mitochondrienhülle und zentralem Apparat. Beachte die dichte Matrix der Mitochondrien.

Vergrößerung 1:56 000



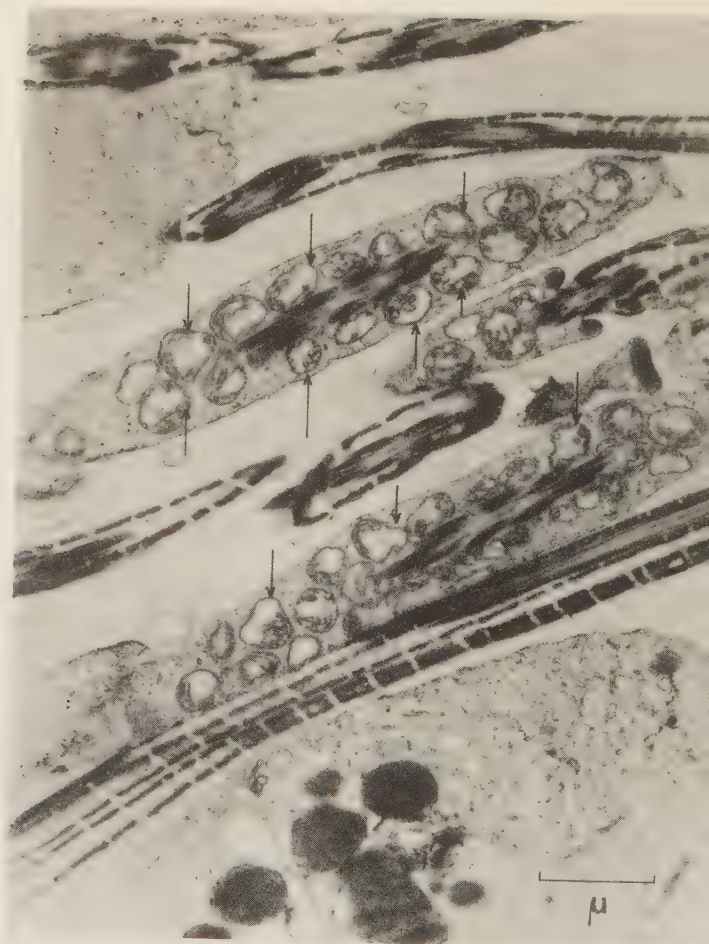


Abb. 29 Hoden, erwachsene Ratte. Spermatiden mit deutlicher Schwellung der Mitochondrien. 9 Tage Thiamphenicol. Vergrößerung 1/28 000

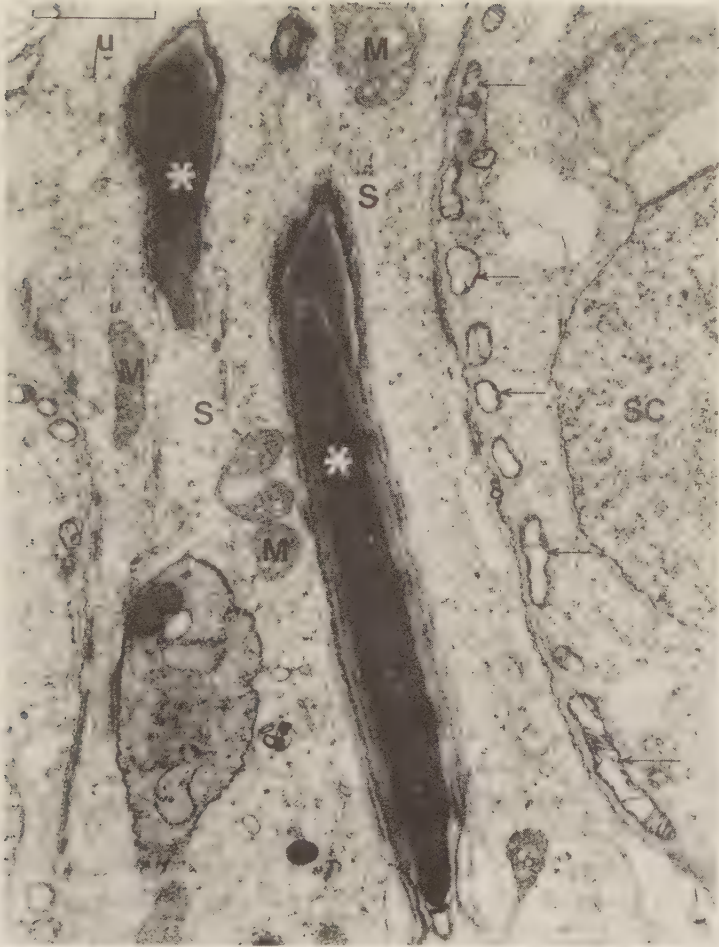


Abb.3o Hoden der erwachsenen Ratte, 9 Tage hohe Dosen Thiamphenicol (siehe Seite 69). Sertolizelle (S) mit relativ intakten Mitochondrien und eingeschlossenen Spermienköpfen (\*). Daneben ein Spermatocyt (Sc) mit stark geschwollenen Mitochondrien (↓). Vergrößerung 1:28 000

3.2.9 Einfluß von Chloramphenicol, Thiamphenicol und Oxytetracyclin auf die spezifische Cytochromoxidaseaktivität der Morris-Hepatome 7800 und 5123 D, der Leber tumortragender Tiere und der Leber normaler erwachsener Ratten

Die Folgen einer Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese auf die spezifische Aktivität des Atmungsfermentes in Morris-Hepatomen rufen deshalb Interesse wach, weil diese Tumoren zwar schneller als ihr Stammgewebe, die Leber, wachsen, andererseits aber BASS eine gegenüber normaler Leber um das ca. dreifache verlängerte Halbwertszeit mitochondrialer Proteine fand. Dabei wurde der Abfall der Radioaktivität mitochondrialer Proteine in der Leber von Tieren gemessen, denen am Tag 0 einmalig S<sup>35</sup>-markiertes Methionin injiziert worden war.

Überraschenderweise führt eine intravenöse Dauerinfusion von 1000 mg oder sogar nur 500 mg Chloramphenicol/kg und Tag innerhalb von wenigen Tagen zu einem Abfall der spezifischen Cytochromoxidaseaktivität, der bei beiden Tumoren einer "Halbwertszeit" von drei Tagen entspricht (Tab.17). Mit einer Oxytetracyclin-Dosis von 400 mg am ersten und 200 mg am zweiten Behandlungstag gelangt man zu gleichen "Halbwertszeiten", ein erneuter Hinweis, daß dieses Antibiotikum gleiche biochemische Wirkungen zu entfalten imstande ist wie Chloramphenicol oder Thiamphenicol, wenn nur dem unterschiedlichen pharmakokinetischen Verhalten und der geringeren Penetrationsfähigkeit des Tetracyclins Rechnung getragen wird. Thiamphenicol führt zu fast gleichen Ergebnissen, während für Chloramphenicol die Werte aber dann wesentlich herausfallen, wenn es in zwei täglichen Einzeldosen intraperitoneal appliziert wird, was auch bei tumortragenden Tieren die Vorteile einer intravenösen Dauerinfusion beweist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Embryo wird Chloramphenicol beim tumortragenden Tier wesentlich langsamer eliminiert. Über eine verminderte Aktivität arzneimittelabbauender Enzyme in der Leber und den Tumoren von tumortragenden Tieren ist mehrfach berichtet worden (NEUBERT und HOFFMEISTER, BRONEN et al., KATO et al.). So konnten CHATTOPADHYAY et al. in keinem der von Ihnen untersuchten Morris-Hepatome Cytochrom P 450 oder Cytochrom b<sub>5</sub> nachweisen, beide Cytochrome waren auch in der Leber der Tumor-Tiere deutlich vermindert. Auffällig ist, daß die Hemmung der Enzymaktivität bei den intraperitoneal mit Chloramphenicol behandelten Tieren ("CAP I.P. TU" und "Tu-Le") in den Tumoren ausge-

| Tumor  | Behandlungs-<br>dauer | Behandlungs-<br>art | n        | Cytox/DNA      | %Hemmung | p       | "t/2 Cyttox"<br>in Stunden |
|--------|-----------------------|---------------------|----------|----------------|----------|---------|----------------------------|
| 7800   | 48 <sup>h</sup>       | Kontrolle Tu        | 2        | 27,9 $\pm$ 3,3 |          |         |                            |
|        |                       | CAP-DI 1000<br>Tu   | 3        | 18,8 $\pm$ 1,8 | 33       | < 0,02  | 74                         |
| 5123 D | 84 <sup>h</sup>       | NaCl-Di Tu          | 4<br>(8) | 8,4 $\pm$ 1,3  |          |         |                            |
|        |                       | CAP-DI 500<br>Tu    | 2<br>(4) | 3,0 $\pm$ 0,01 | 64       | < 0,005 | 66                         |
|        |                       | Kontrolle Tu        | 7        | 12,4 $\pm$ 2,2 |          |         |                            |
|        |                       | Tu-Le               | 8        | 5,46 $\pm$ 0,8 |          |         |                            |
|        |                       | Tu                  | 4        | 9,7 $\pm$ 1,4  | 22       | < 0,05  | 109                        |
|        |                       | Tu-Le               | 4        | 5,1 $\pm$ 0,7  | 7        | > 0,05  | 342                        |
| 7800   | 48 <sup>h</sup>       | CAP i.p.<br>500     |          |                |          |         |                            |
|        |                       | Tu                  | 8        | 8,6 $\pm$ 0,8  | 31       | 0,0002  | 77                         |
|        |                       | Tu-Le               | 7        | 3,8 $\pm$ 0,7  | 30       | < 0,001 | 80                         |
|        |                       | Tu                  | 6        | 8,1 $\pm$ 1,2  | 35       | < 0,001 | 68                         |
|        |                       | OTC<br>400/200      |          |                |          |         |                            |
|        |                       | Tu-Le               | 9        | 3,5 $\pm$ 0,7  | 35       | 0,0002  | 68                         |

Tab. 17 Einfluß einer Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese durch Chloramphenicol (CAP), Thiamphenicol (TAP) und Oxytetracyclin (OTC) auf die spezifische Cytochromoxidaseaktivität in den mittelschnellwachsenden Morris-Hepatomen 7800 und 5123 D. Tu= Tumor, Tu-Le= Leber des tumortragenden Tieres, Di= i.v.-Dauerinfusion, NaCl= physiol. NaCl-Succinat-lösung. Indices: mg appl. Substanz/kg und Tag. OTC 400/200= 400 mg am ersten, 200 mg am zweiten Tag. Die angegebenen %Hemmung wurden jeweils gegenüber den Tumoren bzw. den Lebern der tumortragenden Tiere errechnet. n=4 (8) = 8 verschiedene Tumoren wurden zu vier Präparationen verwendet.

|            | n | Tier-<br>gewicht (g) | Leber-<br>gewicht (g) | Gesamt-DNA<br>d. Leber (mg) | Cytox/DNA      |
|------------|---|----------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------|
| Kontrollen | 5 | 182 ± 12             | 6,0 ± 0,3             | 20,08 ± 1,9                 | 17,5 ± 1,8     |
| OTC        | 6 | 177 ± 23             | 6,20 ± 0,9            | 20,02 ± 2,4                 | 9,2 ± 1,2      |
| Proz.Hemm. |   |                      | ./.                   | ./.                         | 48% p < 0,0002 |

Tab. 18 Einfluß einer 11-tägigen Behandlung mit 100 mg Oxytetracyclin (OTC)/kg und Tag auf Tiergewicht, Gesamt-DNA-Gehalt der Leber und spezifische Cytochromoxidaseaktivität bei erwachsenen Ratten. n= Anzahl der Tiere.

prägender als in den Lebern ist, was durch den Stoffwechsel des Chloramphenicol bedingt sein muß, denn im gleichen Versuch zeigen ja die mit den kaum metabolisierbaren Antibiotika Thiamphenicol und Oxytetracyclin behandelten Tieren diesen Unterschied nicht. Entweder wird die Verweildauer des Chloramphenicols nicht nur durch die Arzneimittelabbau-Kapazität der Leber, sondern auch des Tumors oder durch Organunterschiede in der Bindung bestimmt, zumal nach intraperitonealer Injektion die Leber des tumortragenden Tieres ja eher und stärker von aktivem Chloramphenicol angeflutet wird als der Tumor selbst. Die Diskrepanz zwischen den von BASS gefundenen Halbwertszeiten von 25 Tagen für mitochondriale Proteine und den hier mehrfach bestätigten Werten von drei Tagen könnte folgende Ursache zugrunde liegen:

1. Entsprechend hohe Antibiotikadosierung reprimiert die mitochondriale Proteinsynthese vollständig. So wird auch eine Reutilisation markierter Aminosäuren verhindert, die durch den Abbau mitochondrialer Proteine frei werden. Bei der Methode der Halbwertszeitbestimmung mit Hilfe markierter Aminosäuren kann eine solche Reutilisation nicht ausgeschlossen werden. Zur Verdünnung des Angebots an markiertem Precursor war bei der Bestimmung der "Halbwertszeit" mitochondrialer DNA (NEUBERT, OBERDISSE, BASS) mehrere Tage lang jeweils eine große Menge an nichtmarkiertem Precursor injiziert worden, um damit Reutilisationseffekte auszuschließen. Dabei wurden für die

mitochondriale DNA ähnliche "Halbwertszeiten" wie für die mitochondrialen Proteine, nämlich 24 Tage, ermittelt. Auf die Injizierung entsprechend hoher Dosen nichtmarkierten Methionins mußte wegen der Gefahr toxischer Effekte verzichtet werden. Eine Antwort auf die Frage, ob eine veränderte Precursor-Reutilisation bei der Makromolekülsynthese in Mitochondrien und anderen Zellorganellen ein generelles Charakteristikum maligner Tumoren und anderer Organe tumortragender Tiere ist, wäre durch die Wiederholung der  $S^{35}$ -Methioninversuche von BASS mit den wie in Tab. 17 angegebenen Applikationen von Inhibitoren der mitochondrialen Proteinsynthese zu erwarten, wobei zusätzlich zumindest auch ein gut-differenziertes, langsam-wachsendes und ein wenig-differenziertes, schnell-wachsendes Hepatom verwendet werden sollte. Der Quotient zwischen den mit beiden Methoden ermittelten Werten wäre dann ein Maß für die Reutilisation.

2. Die Halbwertszeit der Cytochromoxidase unterscheidet sich von derjenigen anderer Komponenten mitochondrialer Proteine.

Auffällig ist, daß die Halbwertszeit für die Cytochromoxidase in der Leber der tumortragenden Tiere ("Tu-Le") hier drei Tage beträgt, während BASS mit der oben erwähnten Methode 7,5 Tage errechnete, so daß auch bei diesem Organ die beiden Möglichkeiten als Ursache für die Differenzen erwogen werden müssen.

Es soll beachtet werden, daß

1. die spezifische Cytochromoxidaseaktivität von Tumor zu Tumor schwankt,
2. bei verschiedenen Generationen des gleichen Tumors unterschiedlich und
3. zumindest im Hepatom 7800 mehr als doppelt so hohe Werte wie in der Leber der tumortragenden Tiere aufweist.

Diese Differenzen in der spezifischen Aktivität eines Schlüsselenzyms eines essentiellen Stoffwechselweges selbst zwischen zwei in ihrem Wachstumsverhalten sehr ähnlichen Morris-Hepatomen verdeutlichen die Gefahr, fehlerhafterweise von Befunden, die bei der Untersuchung an einem einzigen Morris-Hepatom erhoben wurden, auf ein generelles Charakteristikum malignen Gewebes zu schließen.

Eine 11-tägige Behandlung von 180 g schweren Ratten des Wistarstammes S.W.69 führt zu einer scheinbaren Halbwertszeit der Cytochromoxidase von 11 Tagen (Tab. 18). Da aber nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, von welchem Behandlungstag an Oxytetracyclin die im Lebergewebe zur vollständigen

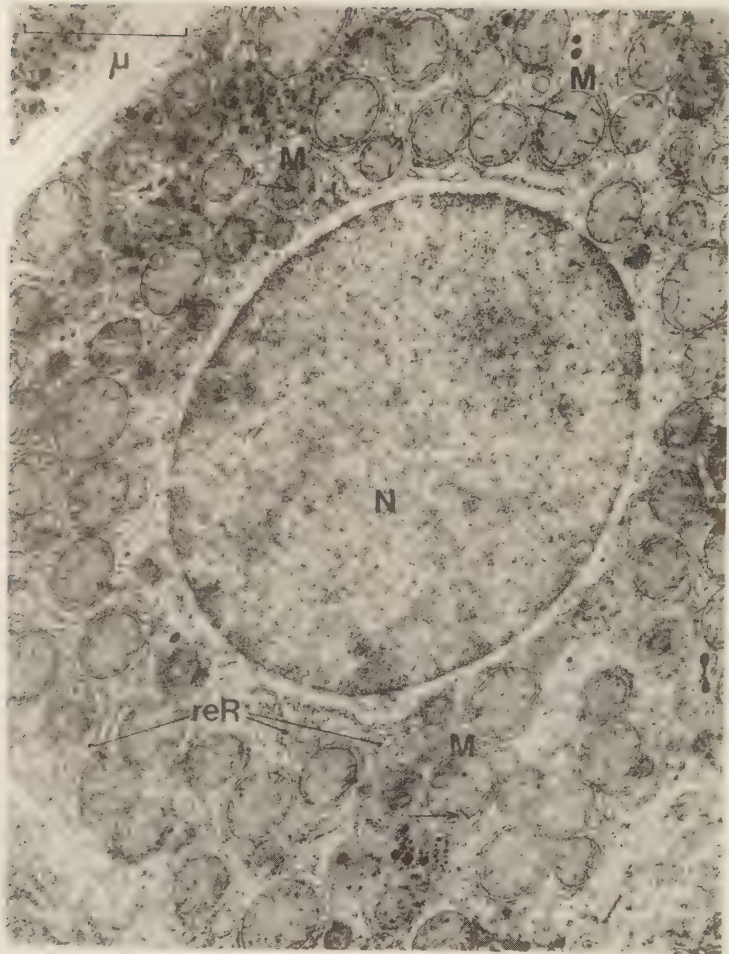


Abb.31 Leberparenchymzelle einer unbehandelten, erwachsenen Ratte. N= Nucleus, M= Mitochondrien mit Cristae (↓), reR= rauhes endoplasmatisches Retikulum.  
Vergrößerung 1:40 000



Abb. 32 Leberparenchymzelle einer erwachsenen Ratte nach 9-tägiger Behandlung mit hohen Dosen Thiamphenicol (siehe Seite 65). Vergrößerte, plumpere Mitochondrien (M) ohne Schwellungserscheinungen, aber vollständigem Fehlen der Cristae. In den Gallenkapillaren (K) vermehrt galleähnliche Substanz (X).

↓ = rauhes endoplasmatisches Retikulum.

Vergrößerung 1:35 000

und permanenten Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese erforderliche Konzentration erreicht, kann aus diesem Wert nur geschlossen werden, daß die "Halbwertszeit" nicht 11 Tage überschreitet. Wie schon bei der regenerierenden Leber, kann auch bei normaler Leber die de-novo-Synthese einer essentiellen Atmungskettenkomponente ohne Rückwirkung auf das Organfeuchtgewicht deutlich eingeschränkt werden, was als erneuter Hinweis für die Überschußaktivität der Cytochromoxidaseaktivität in der Leber erwachsener Tiere gedeutet werden kann. Elektronenoptisch führt eine 9-tägige Behandlung mit hohen Dosen Thiamphenicol (siehe Seite 64) in der Leber zum Verschwinden der Cristae der Mitochondrien (Abb. 22).

#### Thiamphenicol als Tumortheraeutikum

Eine spezifische Wirkung von Thiamphenicol auf Tumorzellen hängt ab von der Überschußaktivität mitochondrial synthetisierter Atmungskettenkomponenten des betreffenden Gewebes, den Unterschieden in der Halbwertszeit dieser Enzyme gegenüber dem gesunden Stammgewebe und der Atmungsabhängigkeit der Tumorzelle. So wäre ein therapeutischer Nutzen bei Hämoblastosen der geringeren spezifischen Cytochromoxidaseaktivität (Abb. 14) eher zu erwarten als z.B. bei Hepatomen. Es ist bislang ungeklärt, ob in den Tumorzellen, die sich in der Ruhephase ( $G_0$ ) befinden, und deren Stoffwechselinaktivität zur Zeit die wesentliche Grenze der Chemotherapie der Tumoren darstellt, die Mitochondrien nicht doch einen meßbaren Umsatz zeigen. Die Ergebnisse bei der Leber erwachsener Tiere (Tab. 18) zeigen, daß zumindest bei diesem kaum proliferierenden Organ die Halbwertszeit der Cytochromoxidase genau so kurz wie die anderer Membran-Proteine ist. Tierexperimentelle Untersuchungen mit Thiamphenicol bei viral und chemisch induzierten Leukämien sollen die tumortheraeutischen Einsatzmöglichkeiten dieses Antibiotikum klären helfen.

Sollten auch in den cytokinetisch ruhenden Stammzellen des Knochenmarks (Reservestammzellen) die Mitochondrien eine relativ kurze Halbwertszeit aufweisen, gäbe dies eine plausible Erklärung für die Pancytopenien ab. Das allerdings seltene Auftreten dieser Nebenwirkung spricht allerdings dagegen, es sei denn, die Mitochondrien dieser Reservestammzellen zeigen unter ganz bestimmten pathologischen Bedingungen wie z.B. schweren Infektionskrankheiten einen erhöhten Umsatz oder die Zellen eine veränderte Permeabilität.

### 3.2.10 Dünndarmepithel

Chloramphenicol bzw. Thiamphenicol und Oxytetracyclin hemmen an allen schnell proliferierenden Geweben die Cytochromoxidasynthese und führen gleichzeitig zu typischen Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur. Da sich Schwellung, Matrixaufhellung und vesikuläre Cristolyse auch an den Mitochondrien des Epithels der Dünndarmmucosa nachweisen lassen (Abb. 33 und 34), ist auch hier eine Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität wahrscheinlich. Gerade nach Tetracyclinen und Chloramphenicol werden klinisch gastrointestinale Nebenwirkungen wie Durchfälle, Meteorismus und Flatulenz beschrieben (BICKEL). Da sogar postantibiotische Enterokolitiden auch ohne Superinfektion auftreten, werden hier "direkt toxische" Mechanismen erörtert (SCHAUB). Einer dieser Mechanismen könnte eine Störung der Funktion des Epithels des Gastrointestinaltraktes durch Cytochromoxidase-Synthesehemmung sein. Die bei längerer Thiamphenicolbehandlung beobachteten Veränderungen des Darminhaltes (S. 66) wurden als Bilirubin-Anreicherung interpretiert, die durch Verminderung der bakteriellen Reduktion zu Urobilin erklärt wurde (SCHAUB). Interessanterweise kommt es an den Gallenkapillaren im Leberparenchym zu den gleichen ultrastrukturellen Veränderungen wie beim cholestatischen Ikterus, wofür der Rückstau von nicht-reduziertem Bilirubin als Ursache diskutiert werden muß (Abb. 32). Über Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur unter Chloramphenicol und Tetracyclinen referierte kürzlich WEBER.



Abb. 53

Zelle aus dem Zottenepithel im Dünndarm einer erwachsenen, unbehandelten Ratte. L= Darmlumen, ZM= Zellmembran, MV= Mikrovilli, M= Mitochondrien mit zahlreichen Cristae und dichter Matrix.

Vergrößerung 1:28 000

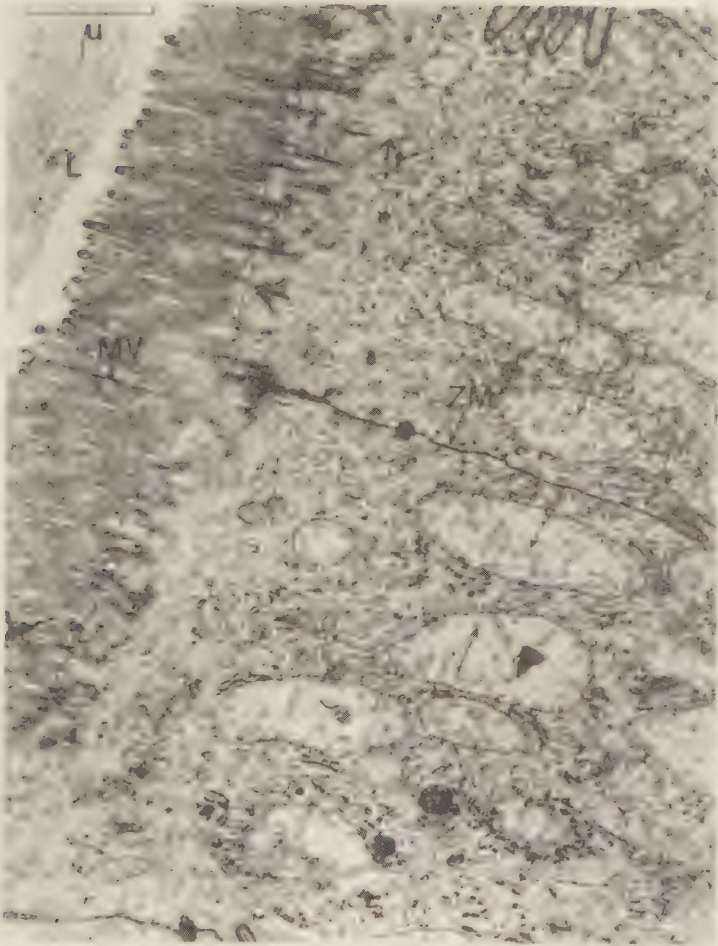


Abb. 34 Apikaler Teil des Zottenepithels im Dünndarm einer erwachsenen Ratte nach 48-stündiger Dauerinfusion von 1000 mg Chloramphenicol/kg und Tag. Deutliche Mitochondrienschwellung und vesiculärer Zerfall der Cristae (↓). MV= Mikrovilli, L= Darm-lumen, ZM= Zellmembran.

Vergrößerung 1:35 000

#### 4. DISKUSSION

##### Wirkungen von Chloramphenicol auf den Stoffwechsel von Säugetierzellen

An isolierten Mitochondrien konnten eine eigene DNA- und RNA-Synthese, ribosomale RNA, Transfer-RNA, Aminoacyl-RNA-Synthetasen, Ribosomen und die Fähigkeit zur Proteinsynthese nachgewiesen werden (Übersicht bei NASS). Es erhob sich die Frage, welche Proteine und insbesondere Enzyme mitochondrial synthetisiert bzw. codiert werden. Einen wesentlichen Fortschritt brachte die Entdeckung, daß Chloramphenicol schon in geringen Konzentrationen in-vivo wie in-vitro ausschließlich die mitochondriale Proteinsynthese (JÄGER und BASS), Cycloheximid dagegen nur diejenige an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums hemmt (SISLER, SIEGEL). FIRKIN und LINNANE schließen aus ihren spektrophotometrischen Untersuchungen an Mitochondrien chloramphenicol-behandelter regenerierender Leber, daß in den Säugetierzellen die unlöslichen, an der inneren Membran strukturgebundenen Cytochrom  $a_3$  (=Cytochromoxidase), b und  $c_1$ , mitochondrial synthetisiert werden. Die ursprüngliche Annahme aber, daß z.B. die Cytochromoxidase nur mitochondrial synthetisiert wird, mußte durch die Untersuchungen von ROUSLIN und SCHATZ bzw. VARY, STEWART und LINNANE revidiert werden: Die Synthese dieses Enzyms erfordert beide Proteinsynthesesysteme, das der Mitochondrien und des Cytosols. WEISS, SEBALD und BÜCHER konnten kürzlich eine gereinigte Cytochromoxidasepräparation aus der Hefe *Neurospora crassa* in fünf verschiedenartige Polypeptide auftrennen, von denen eines auch in Gegenwart von Cycloheximid in hohem Maße radioaktiv markierte Aminosäuren einbaut; dies unterstützt die Ansicht, daß ein Teil des Apoproteins der Cytochromoxidase durch das "intrinsic system" der Mitochondrien synthetisiert wird.

Eine Vielzahl von Autoren bestätigt die Unempfindlichkeit der Proteinsynthese des Cytosols gegenüber Chloramphenicolkonzentrationen bis zu 300 - 500 µg/ml, ein Bereich, in dem die mitochondriale Proteinsynthese zu fast 100% gehemmt wird (FIRKIN; KROON; LAMP; MAGER; siehe Abb. 35). FIRKIN und LINNANE sahen an Chloramphenicol-behandelter regenerierender Leber keinerlei Hemmung mikrosomaler oder löslicher Enzyme des Cytosols. WEISBERGER aber fand an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums von Retikulozyten, daß in-vitro schon sehr niedrige Chloramphenicolkonzentrationen allerdings nur die durch synthetischen oder natürlichen messenger stimulierte Proteinsynthese hemmen, beginnend schon bei 0,032 µg/ml und hundertprozentig bei

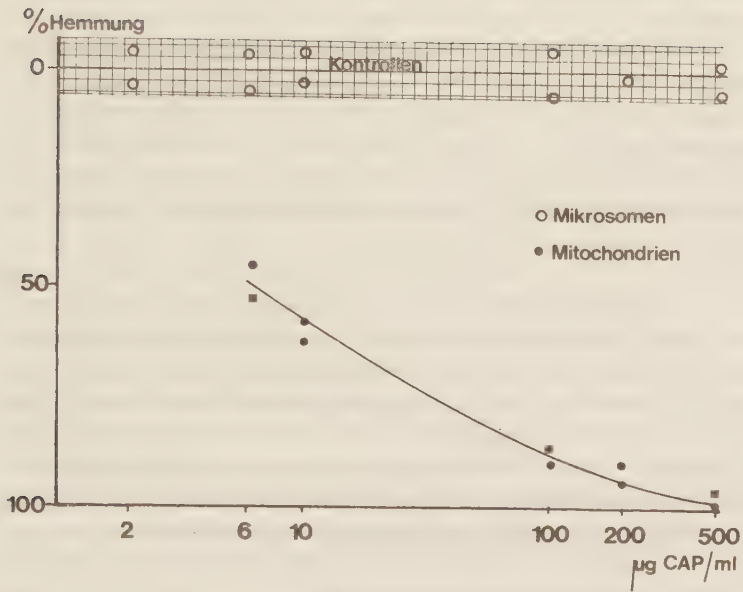


Abb.35: Einfluß verschiedener Dosen Chloramphneicol auf die in-vitro-Proteinsynthese von Mitochondrien und Mikrosomen aus Rattenleber. Ich danke Frau Dr. Jaeger für die freundliche Überlassung der Versuchsdaten.

32 µg/ml Reaktionsmedium. Die Schlußfolgerung, daß die unterschiedliche in-vivo Empfindlichkeit von mikrobiellen und Warmblüter-Zellen durch Unterschiede in der Umsatzgeschwindigkeit oder Stabilität der messenger-RNA erklärt werden kann, war offensichtlich. Ohne zwischen obligatem sideroachrestisch-cytostatischem Überdosierungssyndrom und seltener Knochenmarksaplasie zu differenzieren, führt er die Hämatoxizität des Chloramphenicol auf die Hypothese zurück, daß nur in unreifen Zellen wie proliferierenden Knochenmarkszellen die Ribosomen noch nicht messenger-beladen und so in ihrer Proteinsynthese Chloramphenicol-empfindlich seien.

Die hier vorgelegten Untersuchungen über die Hemmung der Cytochromoxidase-Synthese durch Chloramphenicol bzw. Thiamphenicol im Knochenmark und anderen schnell proliferierenden Geweben erklärt die cytostatischen Symptome als biochemische Zwangsläufigkeit des chemotherapeutischen Prinzips, ohne daß die von WEISBERGER lediglich postulierte Hemmung der mikrosomalen Proteinsynthese durch Chloramphenicol in unreifen Zellen als Ursache herangezogen werden mußte. Trotz zahlreicher Untersuchungen konnte eine Beeinflussung des Nukleinsäurestoffwechsels weder bei Bakterien, Hefen oder Warmblüterorganismen überhaupt nicht oder erst in sehr hohen Konzentrationen (YUNIS und HARRINGTON) gefunden werden.

1967 fanden FREEMAN und HALDAR, daß Chloramphenicol die NADH-abhängige Atmung in Konzentrationen über 300 µg/ml in isolierten Säugetiermitochondrien hemmt. Dieser Befund ist später von FIRKIN und LINNANE an HeLa-Zellen bestätigt worden.

Die Hemmbarkeit der Proteinsynthese an isolierten Säugetierkernen durch Chloramphenicol ist umstritten (JÄGER und BASS), bis jetzt kann nicht entschieden werden, ob ein etwaiger Effekt des Chloramphenicols nicht durch präparative Kontamination mit Mitochondrien bedingt ist.

Eine Hemmung der Antikörpersynthese durch Chloramphenicol und Thiamphenicol wurde in-vitro und in-vivo nachgewiesen (AMBROSE und COONS). Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist bislang unbekannt. Da die primäre Antikörperreaktion bekanntlich eine Phase aktiver Proliferation von immunologischen kompetenten Zellen einschließt, vermuten FIRKIN und LINNANE, daß eine Hemmung der mitochondrialen Cytochromsynthese und damit der ATP-Produktion zu einer Einschränkung dieser Proliferation führt.

### Oxytetracyclin

Auch von den Tetracyclinen ist bekannt, daß sie in-vitro in niedrigen Konzentrationen die Proteinsynthese der Mitochondrien und erst in wesentlich höheren diejenige des Cytosols hemmen (MAGER).

Die Versuche von KROON und DE VRIES und die hier vorliegenden Experimente an regenerierender Leber zeigen in-vivo eine fast vollständige Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese ohne Beeinflussung des Gesamtwachstums, was gegen eine Hemmung der Proteinsynthese an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums in diesem Dosisbereich spricht. Interessanterweise sind von den Tetracyclinen, auch bei höheren Dosen und längerer Therapie, keine sideroachrestischen oder cytostatischen Blutbefunde bekannt. An fast allen hier untersuchten Geweben erzeugt Oxytetracyclin aber die gleichen biochemischen und ultrastrukturellen Veränderungen der Mitochondrien wie Chloramphenicol und Thiamphenicol. Diese Dosen liegen allerdings weit über den therapeutisch empfohlenen. Pharmakokinetische Differenzen zwischen Mensch und Ratte wie beim Chloramphenicol sind von Tetracyclinen nicht bekannt. Therapeutische Tetracyclin-Dosen von 4 mg/kg führen bei Serumkonzentrationen von 1,5 - 2,0 µg/ml zur Bakteriostase (WALTER und HEILMEYER). Diese Werte reichen aber anscheinend nicht für die Konzentrationen an den Mitochondrien aus, die zur Hemmung ihrer Proteinsynthese erforderlich wäre.

Da eine 11-tägige Behandlung erwachsener Ratten mit der hohen Dosis von 100 mg Oxytetracyclin/kg und Tag die Cytochromoxidasynthese in der Leber hemmt, ohne ihr Feuchtgewicht zu reduzieren (Tab.18), können hierbei proteinsynthese-hemmende Konzentrationen in den Mitochondrien erreicht werden.

### Ausblick

Es bestanden bislang erhebliche Zweifel, ob, und wenn ja, weshalb denjenigen Antibiotika cytostatische Wirkungen zugesprochen werden sollen, deren chemotherapeutisches Prinzip auf einer selektiven Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese fußt. Diese Arbeit zeigt, daß Chloramphenicol, Thiamphenicol und Oxytetracyclin als Folge der Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese die de-novo-Synthese der Cytochromoxidase einschränken. Dadurch

kommt es zur Reduktion von Atmung und Wachstum in Abhängigkeit von Proliferationsrate und Überschußaktivität, wie dies am Beispiel embryonalem Gewebes demonstriert werden kann. Unterstrichen wird dies dadurch, daß bei hoher spezifischer Cytochromoxidaseaktivität Feuchtgewicht und DNA-Gehalt des Organs nicht reduziert werden.

Auf Grund der Hemmung von Cytochromoxidase-, Häm- und Hämoglobinsynthese kommt es zu Resorption der Embryonen oder Gewichtsreduktion der neugeborenen Tiere. Deshalb erhebt sich die Frage, ob alle solche Antibiotika als potentiell embryotoxisch anzusehen sind, deren Wirkprinzip einerseits auf einer selektiven Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese beruht, und die sich andererseits pharmakokinetisch und vom Penetrationsvermögen her so verhalten, daß sie schon im Bereich therapeutischer Dosen die mitochondriale Proteinsynthese des Embryos über längere Zeit hemmen. Aus dem gleichen Grunde wäre bei diesen Antibiotika mit dem Auftreten reversibler cytostatischer und sideroachrestischer Symptome im peripheren Blutbild unter der Therapie zu rechnen.

Solange nicht geklärt ist, ob die Einnahme von Chloramphenicol während einer Phase pathologisch gesteigerter Stammzellproliferation durch den gleichen Mechanismus zu irreversiblen Pancytopenien führt, kann auch bei entsprechenden Derivaten diese bislang tierexperimentell nicht reproduzierbare, unvorhersehbare und oft letale Hämatotoxizität nicht ausgeschlossen werden.

Zum anderen zeigen diese Untersuchungen eine Möglichkeit auf, in-vivo die Funktion der mitochondrialen Translation in Differenzierungs- und Proliferationsprozessen und in normalen erwachsenen und malignen Geweben zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen von Antibiotika, die neben der bakteriellen auch die mitochondriale Proteinsynthese hemmen, cytotoxische Effekte zu erwarten sind.

1. Es wird eine von SCHNALTMAN angegebene Methode zur Messung der Aktivität der Cytochromoxidase (E.C.1.9.3.1.) geprüft.
2. Es wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, Ratten ohne Immobilisation über mehrere Tage intravenös zu infundieren.
3. Chloramphenicol, Thiamphenicol und Oxytetracyclin hemmen die de-novo-Synthese der Cytochromoxidase beim Rattenembryo in der Phase der Organogenese. Als Folge kommt es zur Reduktion von Atmung und Gesamtwachstum.
4. Thiamphenicol und Oxytetracyclin hemmen die embryonale Häm synthese stärker als die Proliferation. Auch ultrastrukturell kann die spezifische Hemmung der Hämoglobinsynthese nachgewiesen werden.
5. Schon 48-stündige Behandlung mit 1000 mg Thiamphenicol/kg und Tag führt zum Absterben sämtlicher Embryonen, mit 300 mg ist eine an Tag 14 gemessene Reduzierung des Feuchtgewichtes um ein Viertel auch am 20 Tage alten Feten nachweisbar.
6. Langzeitbehandlung mit 100 mg/kg und Tag Thiamphenicol reduziert im Knochenmark von Meerschweinchen die Cytochromoxidaseaktivität/DNA nach 12 Tagen um die Hälfte, Retikulozyten- und Lymphozytenwerte im Blut sinken früh und stark ab, während Leukozyten- und Erythrozytenzahlen im Normbereich bleiben.
7. Sehr hohe Dosen Thiamphenicol (2000 mg/kg) und Oxytetracyclin (400 mg/kg) hemmen im Rattenhoden die spezifische Cytochromoxidaseaktivität um die Hälfte ohne Feuchtgewicht und DNA-Gehalt des Organs wesentlich zu reduzieren.
8. Chloramphenicol, Thiamphenicol und Oxytetracyclin vermindern in den mittelschnell wachsenden Morris-Hepatomen 5123 D und 7800 nach 48- bzw. 84-stündiger Behandlung die spezifische Cytochromoxidaseaktivität so, daß eine unerwartet kurze "Halbwertszeit" von 68 Stunden errechnet wird. Ähnliche Werte werden in der Leber tumortragender Tiere erzielt.

9. 11-tägige Qxytetracyclinbehandlung reduziert in der Leber erwachsener Ratten die spezifische Cytochromoxidaseaktivität um 50 %, ohne Feuchtgewicht oder DNA-Gehalt zu beeinflussen.

10. Elektronenoptisch demonstrieren sämtliche biochemisch untersuchten Organe und das Dünarmepithel Schädigungen der Mitochondrienstruktur: Schwellung, Matrixaufhellung und vesikuläre Cristolyse.

Aufgrund dieser Untersuchungen wird angenommen, daß in Abhängigkeit von Proliferationsrate, Überschußaktivität und eventuell glykolytischer Kapazität eine selektive Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese durch Antibiotika der Chloramphenicol- und der Tetracyclin-Klasse sicher in toxischen Dosen, möglicherweise aber auch bei langdauernder Verabreichung therapeutischer Dosen über ein Defizit an Atmungskettenkomponenten wie der Cytochromoxidase zur Minderung der Atmung und zu cytostatischen Effekten führt.

## 6. Literatur

- 1 AMBROSE,C.T., COONS,A.H.: Studies on antibody production.  
VIII. The inhibitory effect of chloramphenicol on the synthesis of antibody in tissue culture. J.Exp.Med. 117, 1075-1088 (1963)
- 2 BARRON,E.S.G., DE MEIO,R.H., KLEMPERER,F.: Studies on biological oxidations.  
V. Copper and hemochromogens as catalysts for the oxidation of ascorbic acid. The mechanism of the oxidation. J.Biol.Chemistry 112, 625-640 (1935/36)
- 3 BASS,R.: Some aspects of nucleic acid metabolism and mitochondrial biogenesis in Morris-hepatoma. 3<sup>rd</sup> Symposium on Hepatoma, Philadelphia 1971, Org. S. Weinhouse.
- 4 BICKEL,G.: Les accidents de la therapeutique antibiotique.  
Helv. Med. Acta 22, 300-321 (1955)
- 5 BOREI,H.in: Ark. Kemi Min.Geol. 20A, no.8. Zit. nach SLATER 1949
6. BRATTON,A.C., MARSHALL,E.K.Jr.: A new coupling component for sulfanilamide determination. J.Biol.Chem. 128, 537-550 (1939)
7. Brit.Med.J.: Leading article. Toxicity of chloramphenicol. 1, 649, 1967
8. BROWN,H.D., CHATTOPADHYAY,S.K., PENNINGTON,S.N., SPRATT,J.S., MORRIS,H.P.:  
Mixed function oxidation in tumors. Brit.J.Cancer 25, 135 (1971)
9. BURTON,K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.  
Biochem.J. 62, 315-323 (1956)
- 10.CHANCE,B.: The reactivity of hemoproteins and cytochromes. The second Keilin Memorial Lecture. Biochemical J. 103, 1-18 (1967)
- 11.CHATTOPADHYAY,S.K., BROWN,H.D., MORRIS,H.P.: Further studies of electron transport components of morris hepatoma-bearing rats. Brit.J.Cancer 26, 3-5 (1972)

12. COHLAN, S.O., BEVELANDER, G., TIAMISIC, T.: Growth inhibition of premature receiving tetracycline. *Amer. J. Dis. Child.* 105, 453-459 (1963)
13. COURTNEY, K.D., VALERIO, D.A.: Teratology in the macaca mulatta. *Teratology* 1, 163-172, 1969
14. DETJUK, E.S., VDOWITSCHENKO, I.A., KARTYSCH, G.A.: Tetracycline effect on embryogenesis of albino rats. *ANTIBIOTIKI* 16, 923-926, 1971
15. DIXON, R.L., FOUTS, J.R.: Inhibition of microsomal drug metabolic pathways by chloramphenicol. *Biochem. Pharm.* 11, 715-720 (1962)
16. DUVE, C.de: A spectrophotometric method for the simultaneous determination of myoglobin and hemoglobin in extracts of human muscle. *Acta chem. Scand.* 2, 264-271 (1948)
17. EHRLICH, P.: *Frankfurter Zeitung* 51, 244 (4.9.1906)
18. ESTABROOK, R.W.: Mitochondrial Respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In: *Methods in Enzymology*, Vol. X, p. 41-47, 1967 New York und London.
19. EVERETT, N.B., TYLER, R.: Lymphopoiesis in the thymus and other tissues: functional implications. *Int. Rev. Cytol.* 22, 205-211, 1967
20. FILIPPI, B.: Antibiotics and congenital malformations: evaluation of the teratogenicity of antibiotics. In: WOOLAM, D.H.M.: *Advances in Teratology*. Vol. II, p. 249-251. Academic Press, Los Angeles Press 1967
21. FIRKIN, F.C., LINNANE, A.W.: Differential effects of Chloramphenicol on the growth and respiration of mammalian cells. *BBRC* 32, 398-402, (1968)
22. FIRKIN, F.C., LINNANE, A.W.: Biogenesis of mitochondria. 8. The effect of chloramphenicol on regenerating rat liver. *Exp. Cell Res.* 55, 68-76 (1969)
23. FLENKER, H., REMMELE, W.: Beitrag zur pathologischen Anatomie der Panmyelophthise nach Chloramphenicol-Medikation (Bericht über 18 Fälle). *Beitr. Path.* 145, 8-23 (1972)

24. FREEMAN, K.B., HALDAR, D.: The inhibition of NADH-oxidation in mammalian mitochondria by chloramphenicol. BBRC 28, 8-12 (1967)
25. FRITZ, R., HESS, B.: The effect of chloramphenicol on the prenatal development of rats, mice and rabbits. Tox. Appl. Pharm. 19, 667-674 (1971)
26. FUCHS, T., NEDDEN, K., KAHN, M.: Serum concentration and elimination of chloramphenicol in normal and impaired renal function. Proceedings of the 7<sup>th</sup> international congress on chemotherapy, Prag 1971
27. GLAZKO, A.J., WOLF, M., DILL, W.A.: Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin). I. Colorimetric Methods for the determination of chloramphenicol and related compounds. Arch. Biochem. 23, 411-418 (1949)
28. HAAS, R.J.: Die Rolle cytokinetisch ruhender Zellen für die Regeneration eines aplastischen Knochenmarks - Autoradiographische Untersuchungen an der Ratte. Ärztl. Forschung 25, 185-194 (1972)
29. HERRMANN, H., BOSS, M.B., FRIEDENWALD, J.S.: The oxidation of ascorbic acid by oxidized adrenalin and cytochrome c. J. Biol. Chem. 164, 773-781 (1946)
30. HIGGINS, G.M., ANDERSON, R.M.: Experimental pathology of the liver. I. Restauration of the liver of the white rat following surgical removal. Amer. Med. Ass. Arch. Path. 12, 186 (1931)
31. HILL, J.M.: The cytochrome c-catalysed oxidation of ascorbate in the presence of sodium sulphate and N-N-N'-tetramethyl-p-phenylendiamine. Biochem. J. 118, 677-678 (1970)
32. HILSCHER, W.: Beiträge zur Orthologie und Pathologie der Spermatogoniogenese der Ratte. Fortschr. Med. 84, 719-754 (1966)
33. JAEGER, E., BASS, R.: Comparative studies on the effect of various inhibitors of protein synthesis in nuclei, mitochondria, and microsomes of rat liver and embryos. Fifth international congress on Pharmacology, Abstracts. San Francisco 1972.

34. JAKOVČIĆ, S., HADDOCK, J., GETZ, G.S., RABINOWITZ, M., SWIFT, H.: Mitochondrial development in liver of foetal and newborn rats. *Biochem.J.* 121, 341-347 (1971)
35. KALTWASSER, J.P., KHAN, M.H., LEUSCHNER, U., SIMON, B., STILLE, W., WERNER, E.: The hematotoxic aspects of thiamphenicol. First meeting of the European Division of the international Society of Hematology. Milano, 1971, Abstracts, p. 136.
36. KATO, R., FRONTINO, G., VASSANELLI, P.: Decreased activities of liver microsomal drug metabolizing enzymes in the rats bearing Walker carcinosarcoma. *Experientia* 19, 31 (1963)
37. KEISER, G.: Erworbene Panmyelopathien. *Schweiz. Med. Wschr.* 100, 938-948 (1970)
38. KÖHLER, E., MERKER, H.J., EHMKE, W., WOJNOROWICZ, F.: Growth kinetics of mammalian embryos during the stage of differentiation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 272, 169-181 (1972)
39. KROON, A.M.: Protein synthesis in mitochondria. III. On the effects of inhibitors on the incorporation of amino acids into protein by intact mitochondria and digitonin fractions. *Biochem. Biophys. Acta* 108, 275-284 (1965)
40. LAMB, A.J., CLARK-WALKER, G.D., LINNANE, A.W.: The biogenesis of mitochondria. 4. The differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems in vitro by antibiotics. *Biochem. Biophys. Acta* 161, 415-427 (1968)
41. LEE, Ch., SOTTOCASA, G.L., ERNST, L.: Use of artificial electron acceptors for abbreviated phosphorylating electron transport: flavin-cytochrome c. In: *Methods in Enzymology*, Vol. X, S. 33-37, New York und London 1967
42. LEHNINGER, A.L., UL HASSAN, M., SUDDUTH, H.C.: Phosphorylation coupled to the oxidation of ascorbic acid by isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 210, 911-919 (1954)
43. LEHNINGER, A.L.: *Biochemistry*, Worth Publishers New York 1970, p. 379-380

44. LÖBBECKE, E.A., SCHULTZE, B., MAURER, W.: Variabilität der Generationszeit bei fetalen Zellarten der Ratte. *Exp.Cell.Res.* 55, 176-184 (1969)
45. MACKLER, S.: Studies of mitochondrial energy systems during embryogenesis in the rat. In: *Metabolic pathways in mammalian embryos during organogenesis and its modification by drugs*. Free University press. Berlin 1970
46. MAGER, J.: Chloramphenicol and chlortetracycline inhibition of amino acid incorporation into proteins in a cell-free system from *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem.Biophys.Acta* 38, 150-152 (1960)
47. MALEY, G.F., LARDY, H.A.: Phosphorylation coupled with the oxidation of reduced cytochrome c. *J.Bio.Chem.* 210, 903-910 (1954)
48. MANYAN, D.R., YUNIS, A.A.: The effect of chloramphenicol-treatment on the ferro-chelatase-activity in dogs. *BBRC* 926-931 (1970)
49. MARTELO, O.J., MANYAN, D.R., SMITH, U.S., YUNIS, A.A.: Chloramphenicol and bone marrow mitochondria. *J.Lab.Clin.Med.* 74, 927-940 (1969)
50. MAXWELL, C.R., KAMPER, C.S., RABINOWITZ, M.: Hemin control of globin synthesis: an assay for the inhibitor formed in the absence of hemin and some characteristics of its formations. *J.Mol.Bio.* 58, 317-327 (1971)
51. METCALF, D.: Lymphocyte kinetics in the thymus. In: *The Lymphocyte in immunology and haemopoiesis*. J.M.YOFFEY (Ed) London, Edward Arnold. 1967 p. 333
52. MINNAERT, K.: The kinetics of cytochrome c oxidase I. The system: cytochrome-c-cytochromoxidase-oxygen. *Biochem.Biophys.Acta* 50, 23-34 (1961)
53. McChesney, E.W., KOSS, R.F., SHEKOSKY, J.M., DEITZ, W.H.: Metabolism of dextrosulphenidol in several animal species. *J.Am.Pharm.Ass.* 49, 762-766 (1960)
54. NASS, N.M.K.: Mitochondrial DNA: Advances, problems and goals. *Science* 165, 25-35 (1969)

55. NEUBERT,D., OBERDISSE,E., BASS,R.: Biosynthesis and degradation of mammalian mitochondrial DNA. In: Biochemical Aspects of the biogenesis of mitochondria. Ed. by SLATER,E.C., TAGER,J.M., PAPA,S., QUAGLIARELLO,E.: Adriatica Editrice Bari 1968, p. 103-128
56. NEUBERT,D., HOFFMEISTER,J.: "Aktivität einiger TPN-bedürftiger, leberspezifische Fermentsysteme in der "Mikrosomen"-Fraktion eines experimentellen Ratten Hepatoms". Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmak. 239,219 (1960)
57. PÄTAU,K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine neue t-Tafel). Biol.Zbl. 63, 152 (1943)
58. POLLAK,J.K.: Amino acid metabolism of growing tissue. I. Alanine-glutamic acid transaminase activity of regenerating rat liver. Exp.Cell.Res. 19, 156-163 (1960)
59. ROODYN,D.B., REIS,P.J., WORK,T.S.: Protein synthesis in mitochondria. Requirements of the incorporation of radioactive amino acids into mitochondrial protein. Biochem.J. 80, 9-21 (1961)
60. ROUSLIN,W., SCHATZ,G.: Interdependence between promitochondrial and cytoplasmic protein synthesis during respiratory adaption in Baker's yeast. BBRC 37, 1002-1007 (1969)
61. RUBIN,D., WEISBERGER,H.S., BOTTI,R.E., STORAASLI,J.P.: Changes in iron metabolism in early chloramphenicol toxicity. J.Clin.Invest. 37,1286-1292, (1958)
62. SANADI,D., JACOBS,E.E.: Assay of oxidative phosphorylation at the cytochrom oxidase region (site III). In: Methods in Enzymology, Vol. X,p. 38-47, New York and London 1967
63. SAXEN,L.: Drug induced teratogenesis in vitro: Inhibition of Calcification by different tetracyclines. Science 153,1384-1387 (1966)
64. SCHAUB,F.: Schäden und Krankheiten nach Behandlung mit Antibiotika. Internist 3, 431-437 (1962)
65. SCHNAITMAN,C., ERWIN,V.G., GREENAWALT,J.W.: The submitochondrial Localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. J.Cell.Biol. 32, 719-735 (1967)

66. SCHNAITMAN, C., GREENAWALT, J.W.: Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J. Cell. Biol.* 38, 158-175 (1968)
67. SCHNEIDER, W.C., POTTER, V.R.: The assay of animal tissues for respiratory enzymes. II. Succinic dehydrogenase and cytochromoxidase. *J. Biol. Chem.* 149, 217-227 (1943)
68. SILVA, N.O.G., ANDRADE, A.T.L.: The effects of thiamphenicol upon the rat conceptus. Fertility and sterility 21, 431-433 (1970)
69. SISLER, H.D., SIEGEL, M.R.: Cycloheximide and other glutarimide antibiotics. In: Antibiotics - mechanism of action. Ed. by GOTTLIEB, D. and SHAW, P.D. p. 283-307 Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967
70. SLATER, E.C.: The measurement of the cytochrome oxidase activity of enzyme preparations. *Biochem. J.* 44, 305-318 (1949)
71. SLATER, E.C.: Application of inhibitors and uncouplers for the study of oxidative phosphorylation. In: Methods In Enzymology, Vol. X, New York-London 1967, p.
72. SMITH, L., CAMERINO, P.W.: Comparison of the polarographic and spectrophotometric assays for cytochrom-c-Oxidase Activity. *Biochemistry* 2, 1428-1432 (1963)
73. SPIELMANN, H., LÜCKE, I.: Problems connected with the measurement of the respiratory rate of whole rat embryos in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 270, 10-17 (1971)
74. STOTZ, E., ALTSCHUL, A.M., HOGNESS, T.R.: The cytochrom-c - cytochromoxidase complex. *J. Biol. Chem.* 124, 745-752 (1938)
75. TAKAYA, M.: Teratogenic effects of antibiotics. *J. Osaka City Med. Center* 14, 107-116 (1965)
76. TOAFF, R., RAVI'D, R.: Tooth discoloration due to tetracyclines. In: MEYLER, L., PECK, H.M. (Ed): Drug induced diseases Vol. 3, Excerpta Medica Foundation 1968 117-133

77. VARY, M.J., STEWART, M., LINNANE, A.M.: Biogenesis of mitochondria. XVII.  
The role of mitochondrial and cytoplasmic ribosomal protein synthesis  
in the oxygen-induced formation of yeast mitochondrial enzymes. Arch.  
Biochem. Biophys. 141, 430-439 (1970)
78. VÖMEL, W., SPINGLER, H.: Ein neuer geschmackfreier Chloramphenicol-ester (Chlor-  
amphenicol-3-Stearoylglykolat). Arzneimittel-forschung 8, 123-126 (1959)
79. WALTER, A.M., HEILMEYER, L.: Antibiotika-Fibel. Antibiotika und Chemotherapie.  
Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1969, Seite 272.
80. WEISBERGER, A.S., WOLFE, S., ARMENTROUT, S.: Inhibition of protein synthesis in  
mammalian cell-free systems by chloramphenicol. J. Exp. Med. 120,  
161-181 (1964)
81. WEBER, E., GROSS, G., HORSCH, R., HAHN, K.-J.: "Influence of tetracyclines on isolated  
mitochondria" (Zur Beeinflussung der Mitochondrienfunktion durch Tetracyc-  
line) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 247, R 122 (1972)
82. WEISS, H., SEBALD, W., BÜCHER, Th.: Cycloheximide resistant incorporation of amino  
acids into a polypeptide of the Cytochrome Oxidase of *Neurospora crassa*.  
Eur. J. Biochem. 22, 19-26 (1971)
83. WHARTON, D.C., TZAGOLOFF, A.: Cytochrome Oxidase from beef heart mitochondria.  
In: *Methods in Enzymology*, Vol. X, p. 245-250, New York-London 1967
84. WHARTON, D.C., GRIFFITHS, D.E.: Studies on the electron transport system. XXXIX.  
Assay of Cytochromoxidase. Effect of Phospholipids and other factors.  
Arch. Biochem. Biophys. 96, 103-114 (1962)
85. YONETANI, T.: Studies on Cytochrome Oxidase III. Improved Preparation and some  
Properties. J. Biol. Chem. 236, 1680-1688 (1968)
86. YUNIS, A.A., HARRINGTON, W.J.: Pattern of inhibition by chloramphenicol of nucleic  
acid synthesis in human bone marrow and leukemic cells. J. Lab. Clin. Med.  
56, 831-838 (1960)

87. ZAMBON, S.p.A.: Differences in the hemiatic alterations following treatment with thiamphenicol and chloramphenicol. Milano-Vicenza 1971.
88. ZELKOWITZ, L., ARIMURA, G.K., YUNIS, A.A.: J.Lab.Clin.Med. 71, 596-609 (1968)  
Chloramphenicol and protein synthesis in mammalian cells.

Detlef Oerter

Lebenslauf

|                             |                                                                                              |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 21. 5. 1943                 | Geburt in Berlin als Sohn des Offiziers Kurt Oerter und seiner Ehefrau Edelgard, geb. Maaß.  |
| 1949 - 1953                 | Besuch der Grundschule und von                                                               |
| 1953 - 1962                 | des-altsprachlichen Zweiges des Gymnasiums Adolfinum in Bückeburg                            |
| 1962 - 1969                 | Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin                                    |
| Juni 1969 -<br>Oktober 1969 | Medizinalassistent auf der Chirurgischen Abteilung des Jüdischen Krankenhauses in Berlin und |
| Nov. 1969 -<br>April 1970   | an der Medizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz der FU Berlin                |
| Seit 1. 5. 1970             | Doktorand am Pharmakologischen Institut der FU Berlin, Abt. Embryonalpharmakologie.          |



